

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Desregulación del sistema endocannabinoide en las ataxias
espinocerebelosas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Aurora Rodríguez Cueto

Directores

Javier Fernández Ruiz
María Gómez Ruiz
M^a Luz Hernández Gálvez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**DESREGULACIÓN DEL SISTEMA
ENDOCANNABINOIDE EN LAS ATAXIAS
ESPINOCEREBELOSAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carmen Aurora Rodríguez Cueto

Bajo la dirección de los doctores

Javier Fernández Ruiz
María Gómez Ruiz
M^a Luz Hernández Gálvez

MADRID, 2015

DESREGULACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LAS ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS

Carmen Aurora Rodríguez Cueto

Madrid, 2015

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Directores de la tesis:

Javier Fernández Ruiz
María Gómez Ruiz
M^a Luz Hernández Gálvez

DR. JAVIER FERNÁNDEZ RUIZ, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

DRA. MARÍA GÓMEZ RUIZ, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Psicobiología en la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid.

DRA. M^o LUZ HERNÁNDEZ GÁLVEZ, Titular del Departamento de Psicobiología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “desregulación del sistema endocannabinoide en las ataxias espinocerebelosas” presentada por Carmen Aurora Rodríguez Cueto, licenciada en Química y Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado.

V^oB^o

V^oB^o

Dr. Javier Fernández Ruiz

Dra. María Gómez Ruiz

V^oB^o

Dra. M^a Luz Hernández Gálvez

*A mi padre, Ismael,
por ser la persona que más admiro*

*A mi madre, M^a Ángeles,
por todo el amor que me ha dado*

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, gracias al disfrute de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia e Innovación (programa FPI, referencia BES-2010-040208). Una parte del trabajo presentado ha sido realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología, en el Medical College of Wisconsin, Milwaukee, EEUU, con la ayuda de una beca de estancia breve del Ministerio de Economía y Competitividad (Referencia EEBB-I-13-07671).

Este trabajo de Tesis ha sido financiado por las ayudas a los proyectos:

- “Estudio de los mecanismos implicados en la neuroprotección con cannabinoides antioxidantes y agonistas CB₂ en varias enfermedades neurodegenerativas” (Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa nacional de biomedicina, referencia SAF- 2009-11847).
- “Evaluación de los cannabinoides como potenciales fármacos neuroprotectores en las ataxias espinocerebelosas” (Fundación Eugenio Rodríguez Pascual).
- “Neurofarmacología del sistema endocannabinoide: del laboratorio a la clínica”. (Programa de Actividades de I+D de los Grupos de Investigación de la Comunidad de Madrid en Biomedicina (CANNAB-CM), Ref. S2010/BMD-2308)
- “Identificación y caracterización molecular de subpoblaciones de receptores cannabinoides en poliglutaminopatías” (Proyectos Cooperativos del CIBER Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, referencia PI2013/05-2).

ABREVIATURAS

Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
2-OG	2-oleilglicerol
a. C	Antes de Cristo
A_{2A}	Receptor A _{2A} de adenosina
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenil ciclasa
ADCA	Ataxia autosómica dominante (<i>autosomal dominant cerebellar ataxia</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	Anandamida o N-araquidonoiletanolamina
Akt	Proteína quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARA-S	N-araquidonil-L-serina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
atxn-3	Ataxina 3
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
Bs	Tronco encefálico (<i>brainstem</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CAG	Trinucleótido que codifica glutamina
CALB	Calbindina
CB₁	Receptor cannabinoide tipo 1
CB₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CD68	Cúmulo de diferenciación 68, marcador de macrófagos/microglía
cit c	Citocromo C
cNOS	Óxido nítrico oxidasa constitutiva (<i>constitutive nitric oxide synthase</i>)
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPu	Núcleo caudado-putamen
CREB	Elemento de unión en la respuesta a AMPc
CT	Tomografía computerizada (<i>computed tomography</i>)
Cx	Corteza cerebral (<i>cortex</i>)

DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAG	1,2-Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DARPP32	Fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DRPLA	Atrofia dentado-rubropalido-luysiana (<i>Dentatorubral-pallidoluysian atrophy</i>)
DSE	Supresión de la excitación inducida por la despolarización (<i>depolarization induced suppression of excitation</i>)
DSI	Supresión de la inhibición inducida por la despolarización (<i>depolarization induced suppression of inhibition</i>)
eCB	Endocannabinoide
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Quinasa de regulación extracelular
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos (<i>fatty acid amide hydrolase</i>)
FDG	Fluorodesoxiglucosa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa (<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GB	Globo pálido
GDP	Guanosina difosfato
GFAP	Proteína gliofibrilar ácida (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLAST	Transportador de glutamato y aspartato (<i>glutamate aspartate transporter</i>)
GLT-1	Transportador de glutamato (<i>glutamate transporter</i>)
GPCR	Receptores acoplados a proteína G (<i>G protein coupled receptor</i>)
GPR	Receptores huérfanos acoplados a proteína G (<i>GPCR orphan receptor</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>high performance liquid chromatography</i>)
i.p	Intraperitoneal
IBA-1	Proteína ligante de calcio
IF	Inmunofluorescencia
IHC	Imunohistoquímica
IL1-β	Interleuquina tipo 1- β
IL-4	Interleuquina tipo 4
IL-6	Interleuquina tipo 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IP₃	Inositol 1,4,5-Trifosfato (<i>inositol trisphosphate</i>)
JNK	Quinasa amino terminal de c-Jun
KO	<i>Knockout</i>
KPBS	Tampón fosfato salino con potasio (<i>potassium phosphate buffered saline</i>)
LC/MS	Cromatografía líquida/ espectrofotometría de masas (<i>Liquid Chromatography / Mass Spectrometry</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LTD	Depresión a Largo Plazo (<i>Long-term depression</i>)

LTP	Potenciación a Largo Plazo (<i>long-term potentiation</i>)
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MJD	Enfermedad de Machado–Joseph (<i>Machado-Joseph disease</i>)
MSN	Neurona de proyección estriatal (<i>medium spiny neuron</i>)
mTORC1	Diana de Rapamicina en mamíferos complejo 1 (<i>mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>)
NADA	N-araquidonildopamina
NAE	N-aciletanolaminas
NAPE	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, (<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell</i>)
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato (<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintasa (<i>nitric oxide synthase</i>)
Nrf2	Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>)
NSE	Enolasa específica neuronal (<i>neuron-specific enolase</i>)
OEA	Oleoiletanolamida
p	Probabilidad
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEA	Palmitoiletanolamida
PET	Tomografía por emisión de positrones (<i>Positron Emission Tomography</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol-bi-fosfato (<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PKA	Proteína quinasa activada por AMPc (<i>protein kinase A</i>)
PKC	Proteína quinasa C, (<i>protein kinase C</i>)
PLA	Técnica de <i>Proximity ligation assay</i>
PLC	Fosfolipasa C (<i>phospholipase C</i>)
PLD	Fosfolipasa D, (<i>phospholipase D</i>)
poliQ	Poliglutamina
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (<i>peroxisome proliferator activated receptor</i>)
PPRE	Elemento de respuesta del receptor PPAR (<i>PPAR response element</i>)
r.p.m	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RXR	Receptor del ácido 9-cis retinoico (<i>retinoid X receptor</i>)
SCA	Ataxia espinocerebelosa (<i>spinocerebellar ataxia</i>)
SCA3	Ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (<i>spinocerebellar ataxia type 3</i>)
SCE	Sistema cannabinoide endógeno
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>standard error of the mean</i>)
SNC	Sistema nervioso central

SUV	Valor de captación estándar (<i>standard uptake value</i>)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón Tris/borato con EDTA (<i>Tris-borate-EDTA buffer</i>)
TBS	Tampón Tris salino (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20
TG	Transgénico
Th	Tálamo (<i>Thalamus</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo alfa, (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
TRP	Receptor de potencial transitorio (<i>transient receptor potential</i>)
TRPV	Receptor de vanilloides (<i>transient receptor potential vanilloid receptor</i>)
Ub	Ubiquitina
VOI	Volumen de interés (<i>volumen of interest</i>)
WT	<i>Wildtype</i>

Nota: dado lo extendido del uso de la lengua inglesa en el ámbito científico en muchas ocasiones se han empleado las abreviaturas correspondientes al inglés, ya que es de este modo como son más ampliamente conocidas.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	15
1. Ataxias cerebelosas	17
1.1. Ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes	17
1.2. Ataxias espinocerebelosas causadas por la expansión de poliglutaminas	20
1.2.1. Características clínicas de las ataxias espinocerebelosas poliglutamínicas	21
1.2.2. Neuropatología de las ataxias espinocerebelosas poliglutamínicas	21
1.2.3. Mecanismos moleculares patogénicos en las ataxias espinocerebelosas	25
1.2.4. Terapéutica en las ataxias espinocerebelosas	28
1.2.5. Ataxia espinocerebelosa de tipo 3	28
2. Cannabinoides	30
3. Sistema cannabinoide endógeno	33
3.1. Receptores cannabinoides	33
3.1.1. Receptor CB ₁	34
3.1.2. Receptor CB ₂	35
3.1.3. Otros receptores celulares con actividad cannabinoide	35
3.2. Endocannabinoides	36
3.2.1. Anandamida	37
3.2.2.2-Araquidonoil glicerol	38
3.2.3. Otros ligandos endógenos con actividad cannabinoide	38
3.3. Metabolismo de los endocannabinoides	39
3.3.1. Síntesis de endocannabinoides	39
3.3.2. Proceso de finalización de la señal biológica	40
3.3.2.1. Transporte de endocannabinoides	41
3.3.2.2. Degradación de endocannabinoides	41
3.3.2.3. Endocannabinoides como precursores de otros lípidos bioactivos	42
3.4. Farmacología del sistema cannabinoide endógeno	42
3.4.1. Agonistas de los receptores cannabinoides	42
3.4.1.1. Cannabinoides clásicos	43

3.4.1.2.Cannabinoides no clásicos.....	43
3.4.1.3.Aminoalquilindoles.....	44
3.4.1.4.Derivados eicosanoides.....	44
3.4.2.Antagonistas de los receptores cannabinoides.....	44
3.4.3.Modificadores del tono endocannabinoide.....	44
3.5.Mecanismos de señalización celular acoplados a los receptores cannabinoides.....	45
3.5.1.Mecanismos de transducción de señales mediados por el receptor CB ₁	46
3.5.2.Mecanismos de transducción de señales mediados por el receptor CB ₂	48
3.5.3.Mecanismos de transducción de señales mediados por heterómeros de los receptores cannabinoides CB ₁ y CB ₂	48
3.5.3.1.Heterómeros CB ₁ -A _{2A}	49
3.5.3.2.Heterómeros CB ₁ -CB ₂	49
3.5.4.Mecanismos de transducción de señales mediados por receptores distintos a los receptores CB ₁ y CB ₂	49
3.6.Modulación de la transmisión nerviosa por los endocannabinoides.....	50
3.7.Procesos fisiológicos mediados por los endocannabinoides en el SNC.....	52
3.7.1.Cannabinoides y control motor.....	53
3.7.2.Cannabinoides y regulación de la supervivencia neuronal	56
3.7.2.1.Efectos antiexcitotóxicos.....	59
3.7.2.2.Modulación de la homeostasis del calcio.....	59
3.7.2.3.Efecto antiinflamatorio	59
3.7.2.4.Efecto antioxidante.....	60
3.7.2.5.Regulación de factores neurotróficos y vías de señalización.....	60
3.7.2.6.Efectos sobre la autofagia.....	61
3.7.2.7.Control sobre la temperatura corporal	62
3.7.2.8.Efectos vasodilatadores.....	62
3.7.2.9.Neurogénesis	62
4. Posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides en las SCAS.....	63
4.1.El sistema endocannabinoide en el circuito neuronal afectado en las SCAs.....	63
4.1.1.Localización del receptor CB ₁	63
4.1.2.Localización del receptor CB ₂	65
4.1.3.Localización de las enzimas del metabolismo de endocannabinoides.....	65
4.1.4.Endocannabinoides.....	66

4.1.5. Papel del sistema cannabinoide endógeno en la neurotransmisión en el cerebelo.....	66
4.2. Implicación del sistema cannabinoide endógeno en la disfunción motora.....	67

II. OBJETIVOS.....69

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....73

1. Diseños experimentales.....75

1.1. Diseño experimental I: Caracterización del sistema endocannabinoide en tejido cerebral de pacientes con distintos tipos de SCA.....75

o Sujetos del estudio.....77

1.2. Diseño experimental II: Caracterización del sistema endocannabinoide en un modelo animal de SCA 3.....77

o Animales de experimentación.....77

2. Métodos de análisis.....78

2.1. Estudio del SCE en pacientes con ataxia espinocerebelosa.....78

2.1.1. Inmunohistoquímica.....78

2.1.2. Inmunofluorescencia.....80

2.2. Estudio del SCE en un modelo animal de SCA3.....81

2.2.1. Genotipado de la colonia de ratones SCA3.....81

2.2.2. Determinación de parámetros comportamentales.....81

2.2.2.1. Hanging Wire.....82

2.2.2.2. Barra de equilibrio.....82

2.2.2.3. Rotarod.....83

2.2.2.4. Clasping.....84

2.2.2.5. Footprinting.....84

2.2.2.6. Otras observaciones sobre la situación clínica de los animales.....84

2.2.3. Análisis de supervivencia.....85

2.2.4. Análisis de la actividad metabólica cerebral mediante PET.....85

2.2.5. Técnicas Bioquímicas.....86

2.2.5.1. Preparación de muestras.....86

2.2.5.2. Determinación de endocannabinoides y N-aciletanolaminas por LC/MS.....87

2.2.5.3. Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR.....88

2.2.5.4. Técnica de Western-blot.....89

2.2.6.Técnicas histológicas.....	90
2.2.6.1.Preparación muestras	90
2.2.6.2.Tinción de Azul de Metileno.....	90
2.2.6.3.Inmunohistoquímica.....	91
2.2.6.4.Identificación de heterodímeros mediante la técnica de PLA.....	92
3. Análisis estadísticos.....	93

III. RESULTADOS.....95

1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Caracterización del sistema endocannabinoide en tejido cerebral de pacientes con distintos tipos de ataxia spinocerebelosa.....97

1.1. Evaluación neuropatológica del cerebelo de los pacientes de SCA.....	97
1.1.1. Estudio de la degeneración neuronal.....	98
1.1.2. Estudio de la respuesta glial.....	100
1.2. Análisis del sistema cannabinoide endógeno en el cerebelo de los pacientes de SCA.....	103
1.2.1. Estudio del patrón de distribución del receptor CB1.....	103
1.2.2. Estudio del patrón de distribución del receptor CB2.....	108
1.2.3. Estudio del patrón de distribución de la enzima FAAH.....	114
1.2.4. Estudio del patrón de distribución de la enzima MAGL.....	119
1.3. Discusión parcial.....	124
1.3.1. Evaluación neuropatológica del cerebelo de los pacientes de SCA.....	124
1.3.2. Análisis del sistema sce en el cerebelo de los pacientes de sca.....	124

2.DISEÑO EXPERIMENTAL II: caracterización del sistema endocannabinoide en un modelo animal de ataxia espinocerebelosa tipo 3.....130

2.1.Evaluación del progreso de la enfermedad.....	131
2.1.1.Evaluación funcional y supervivencia.....	131
2.1.1.1.Estado de salud general	131
2.1.1.2. Actividad motora y coordinación.....	133
2.1.1.3. Actividad metabólica cerebral.....	136
2.1.2. Análisis neuropatológico y bioquímico.....	138
2.1.2.1.Estudio de la degeneración neuronal.....	139
2.1.2.2.Estudio de la respuesta glial.....	147
2.2. Análisis del sistema endocannabinoide.....	151

2.2.1. Receptores Cannabinoides CB ₁ Y CB ₂	152
2.2.2. Enzimas de síntesis de endocannabinoides nape-pld y dagl.....	159
2.2.3. Enzimas de degradación de endocannabinoides faah y magl.....	160
2.2.4. Endocannabinoides y lípidos derivados.....	167
2.2.4.1. AEA y N-aciletanolaminas.....	168
2.2.4.2.2-AG y 2-OG.....	170
2.3. Estudio de la formación de heterómeros de los receptores cannabinoides.....	172
2.3.1. Análisis del heterómero cb1-a2a y cb1-cb2.....	173
2.3.2. Análisis del heterómero cb1-cb2.....	175
2.4. Discusión parcial.....	177
2.4.1. Evaluación del progreso de la enfermedad.....	177
2.4.2. Análisis del sistema endocannabinoide.....	179
2.4.3. Estudio de la formación de heterómeros de los receptores cannabinoides	183

V. DISCUSIÓN GENERAL.....	185
----------------------------------	------------

VI. CONCLUSIONES.....	193
------------------------------	------------

VII. BIBLIOGRAFIA.....	195
-------------------------------	------------

VIII. ANEXO

SUMMARY

The autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a group of clinically and genetically heterogeneous neurodegenerative diseases, characterized by loss of balance and motor coordination by dysfunction of the cerebellum or in its afferent and efferent pathways. As a result of a degenerative process which is often not limited to the cerebellum, but is extended to the retina, the optic nerve, the brainstem, basal ganglia, cerebral cortex, spinal cord and peripheral nervous system, extra-cerebellar signs are often associated. To date, more than 24 SCA genes or loci have been identified. The investigations of the genetic background of the SCAs revealed several underlying mutational mechanisms: (i) classical mutations, such as point mutations, frameshift mutations, deletions and duplications; (ii) caused by the coding repeat expansions of CAG (glutamine-codon) triplets; and (iii) non-coding repeat expansions. The most prevalent SCA subtypes belong to the family of polyglutaminopathies, which also includes Huntington's disease, a group of disorder caused by the coding repeat expansions of CAG in specific genes leading to abnormally long polyglutamine tracts in the encoded proteins. All of these disorders show as common features, the progressive neurodegeneration of neuronal subsets in distinct brain areas and the formation of polyQ-containing protein aggregates. Progressive neurodegeneration in polyQ disorders is mediated by mutant proteins capable of inducing neuronal damage and synaptic neurotransmission deficits by interfering with several conserved cellular and molecular pathways including protein aggregation and clearance, dysregulation of transcription and gene expression, the ubiquitin-proteasome system, alterations of calcium homeostasis, mitochondrial failure, excitotoxicity, oxidative stress and local inflammatory events and activation of pro-apoptotic routes among others. These pathways interact and enhance each other leading the accumulation of cellular damage that eventually leads to dysfunction and, ultimately, the demise of neurons through a series of multiple events. This evidence indicates that targeting simultaneously several pathways is necessary to therapeutically prevent neurodegeneration, preserve neuronal function and alleviate the neurological symptoms. However, currently the disease has no cure and also lacks of an effective treatment to alleviate major symptoms and, in particular, to modify disease progression.

On this way, during the last decade, a considerable volume of work has accumulated robust preclinical evidence on the neuroprotective potential of compounds active at the endocannabinoid communicating system, called cannabinoids, a term that includes compounds present in *Cannabis sativa* L. plant (i.e: Δ^9 -tetra-hydrocannabinol (Δ^9 -THC), the principal active component of cannabis) but also synthetic cannabimimetic drugs and certain endogenous signaling lipids. The endogenous cannabinoid system is a ubiquitous lipid signaling system which has important regulatory functions. It is composed of cannabinoid receptors, their endogenous ligands or endocannabinoids (endogenous cannabis-like substances) and the proteins involved in their synthesis and degradation, as well as proteins that regulate endocannabinoid levels and action at receptors. The main endocannabinoids (endogenous cannabis-like substances) are small molecules derived from arachidonic acid, the two most studied are anandamide (AEA, *N*-arachidonoyl-ethanolamine) and 2-AG (2-arachidonoyl-glycerol). They bind to at least two G protein-coupled receptors (GPCRs), known as the cannabinoid type 1 and type 2 receptors (CB₁ and CB₂). Several evidence suggests that there are additional cannabinoid receptors that is, non-CB₁ and non-CB₂ receptors. Other putative cannabinoid

receptors include the ionotropic receptor TRPV1 and some orphan G protein coupled receptors (i.e: GPR55, GPR119), endocannabinoids are also potential ligands for peroxisome proliferator-activated nuclear receptors or PPAR. Endocannabinoids, as other lipid signaling molecules, are released on demand via stimulus-dependent cleavage of membrane phospholipid precursors. Once they are activated specific cannabinoid receptors the endocannabinoids are transported into cells by a specific uptake system and degraded by two well-characterized enzymes, the fatty acid amide hydrolase (FAAH) and the monoacylglycerol lipase (MAGL).

When cannabinoid receptors are activated by cannabinoids multiple intracellular signal transduction pathways are activated, agonist activation triggers inhibition of adenylyl cyclase and voltage-gated calcium channels, activation of potassium channels, mitogen activated protein kinase (MAPK), and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt signaling pathways. CB_1 and CB_2 receptors influence other signal transduction pathways as well. Recently, some studies have shown that certain GPCRs in a variety of different tissues can also form heteromers. For the cannabinoid receptors, heteromers have been shown to exist between CB_1 and the dopamine and adenosine receptors as well as with angiotensin, opioid, and orexin receptors. Interesting CB_1 receptor is capable to form functional heteromers with another related cannabinoid receptors (for example CB_2 and GPR55). Heteromerization of GPCRs is a key to the integration of extracellular signals and the subsequent cell response via additional mechanisms classically attributed to individual cannabinoid receptors.

By activating cannabinoid receptors expressed in the central nervous system (CNS), endocannabinoids can regulate several neural functions. The CB_1 receptor is present throughout the CNS and is particularly abundant in neurons and regulates the release of neurotransmitters. The CB_2 receptor is found in CNS primary in glial cells, regulating their motility and immunomodulatory function, but also in some subpopulations of neurons.

The endocannabinoid system has been proposed as an important modulator of synaptic function in the central nervous system, particularly the retrograde control of excitatory or inhibitory synapses, which enables this system to participate in the control of important neurobiological processes in healthy conditions. However, this physiological relevance acquires a maximal interest in neuropathological conditions affecting either the function or the structures of specific areas of the brain, conditions that have been associated with important changes in the activity of this modulatory system (i.e. ligands, receptors and enzymes). These alterations are frequently deficits but also increases, affect specific elements of this communicating system, have been found even in early and presymptomatic phases of these disorders, and have been characterized in experimental models and, to a lesser extent, in human subjects. They could play an instrumental role in the pathogenesis, presumably aggravating the neuronal injury, although, in some cases, these alterations have been interpreted as being part of an endogenous protectant response against brain damage.

Cannabinoids have been proposed as promising neuroprotective molecules, based on their capability to normalize glutamate homeostasis, reducing excitotoxicity, to inhibit calcium influx, lowering intracellular levels and the subsequent activation of calcium-dependent destructive pathways, and to reduce the generation of reactive oxygen intermediates or to limit their toxicity, decreasing oxidative injury. Cannabinoids are also able to decrease local inflammatory events by acting on glial processes that regulate neuronal survival, among others. These properties of cannabinoid provide relevant targets for developing novel neuroprotective

therapies. Through one or more of these processes, cannabinoids have provided neuroprotection in different animal models of neurodegenerative disorders including Parkinson's disease and Huntington's chorea, Both neurodegenerative disorders characterized for an important neurodegenerative component similar to that was observed in the SCAs. These properties provide cannabinoid targets relevant to the development of new neuroprotective therapies.

In this context, the working **HYPOTHESIS** of this Thesis is that the endocannabinoid system and its possible deregulation in SCAs provides important elements for a greater understanding of the progression of these diseases as well as for the design of potential drug treatments associated with these changes. Whether cannabinoids may afford neuroprotection in SCAs as they did in preclinical models of other neurodegenerative disorders is not the only question requiring experimentation in this family of disorders. Before this, it is necessary to identify the type of changes that the development of cerebellar degeneration in the different SCAs produces in specific elements of the endocannabinoid signaling system. In this respect, to know the changes in endocannabinoid receptors is absolutely necessary as these elements are potential targets for a pharmacological action with cannabinoids in SCAs, and this should help in a better design of a potential therapy to arrest/delay the progression of cerebellar degeneration, as has been followed in other neurodegenerative disorders.

In this context, the specific **AIMS** of this project are:

1. To study the status of the endogenous cannabinoid system in post mortem cerebellum tissue samples from patients affected by some type of SCAs.
2. To identify the possible alterations that occur in the various elements of SCE in brain regions affect during the progress of the disease in an animal model of SCA3, the most prevalent subtype of SCA worldwide.

The **RESULTS** obtained in this Thesis are divided in two Experimental Designs; the first one is related to studies in human samples from patients affected by some types of SCAs. The second one section is related to the studies of encocannabinoid system in a mouse model of SCA3.

In the **FIRST EXPERIMENTAL DESIGN** we tried to determine the presence of histopathological signs of dysfunction/degeneration by immunohistochemical methods in *post-mortem* samples of cerebellum of patients affected by different types of SCAs caused by poliQs. First, we analyzed the neuronal damage using two neuron markers, calbindin, a marker of Purkinje cells and neuron-specific enolase (NSE) a marker of several neurons in this case neurons of the dentate nucleus of the cerebellum. We also analyzed the glial response in the cerebellum of patients affected of SCA, we used two common markers for this type of cells: the microglial marker Iba-1, and the astroglial marker GFAP. We described that samples of cerebellum provided by the Biobank presented important losses of Purkinje cells, as well as of other cerebellar neuronal subpopulations, there was also a marked microgliosis and astrogliosis in the white

matter and cerebellar cortex of SCA tissues as compared with healthy tissues. These findings support the validity of our experimental approach and the use of these tissues to analyze the endocannabinoid system in cerebellum affected by SCA.

In the second part of this section, we studied the status of endocannabinoid system in the post mortem cerebellum of patients affected of SCAs. To achieve this goal, we analyzed by immunohistochemistry the two cannabinoid receptors, CB₁ and CB₂, and the endocannabinoid degrading enzymes, FAAH and MAGL. To establish the cellular localization of those elements of the endocannabinoid system that appear altered in the cerebellum of patients we conducted double-staining analyses with the markers explain before and for the macrophages/microglia marker CD68. We demonstrated that endocannabinoid system is significantly altered in the *post mortem* cerebellum of SCA patients compared to controls subjects. We observed an increase in the immunoreactivity for the CB₁ and CB₂ receptor, and enzymes FAAH and MAGL in the cerebellum of patients that was evident in cerebellar cortex (granular and Purkinje layers) but also in other parts of the cerebellum (white matter and dentate nucleus). The double-staining experiments showed that CB₁ receptors were localized in Purkinje cells and also in astrocytes, reactive microglia and macrophages of the cerebellar white matter. CB₂ receptor was localized in Purkinje cells, Bergmann glia, astrocytes and microglia of the cerebellar white matter. The degrading enzymes, FAAH and MAGL were in Purkinje cells and also in astrocytes of the cerebellar white matter. The identification of various elements of the endocannabinoid system in the Purkinje neurons, which are the main cells affected in SCAs, as well as in glial elements demonstrates that the endocannabinoid system is significantly altered in the cerebellum of SCA patients. The increase changes in endocannabinoid system in glial elements which may be part of an endogenous protective response and serve for developing novel pharmacological therapies based on targeting these receptors to control glial influences on cerebellar neurons. The identification of various elements of the endocannabinoid system in the Purkinje neurons, which are the main cells affected in SCAs, as well as the changes observed in these elements in SCA patients, suggest that alterations in this neuromodulatory system may be related to the pathogenesis of SCAs. This result supports the idea that the endocannabinoid system could be a potential therapeutic target for treating ataxias.

In the **SECOND EXPERIMENTAL DESIGN** of this Thesis, we investigated the progression of the disorder in a new model of SCA, in particular a model of SCA3, the most prevalent subtype of SCA worldwide. The first part of this design was to study the progression of the disorder and neurodegeneration in brain of these animals. For this purpose we did two approaches: (i) the first one was to characterize the progression of neurological deficits in these mice using different behavioral tests related to motor coordination (Rotarod, Hanging Wire, Balance beam, Claspings, Footprinting) and the metabolic activity in brain structures by Positron Emission Tomography. With these neurological data, we defined three different stages for this study: an early symptomatic stage (16 weeks old), an stable symptomatic stage (32 weeks) and an advanced stage (56 weeks); (ii) the second approach was to analyze the neuropathological signs of dysfunction or degeneration in brain regions affected in SCA3 at the three stage of the disorder (15, 31 and 56 weeks). For this purpose we conducted different histological methods using the metilene blue stain and immunohistochemistry for several markers: calbindin (Purkinje cells), Iba-1 (microglia), GFAP (astrocytes) and ubiquitin. We also analyzed by

biochemical methods (western-blot, qRT-PCR) several markers related with the SCA3 pathology and common used to measure neurodegeneration: ataxin-3; calbindin; NSE; medium-sized spiny neuron marker, the major neuron subtype in striatum (DARPP32); glutamate transporters GLT-1 and GLAST; cytokine TNF- α and IL1- β ; and brain derived neural growth factor (BDNF). Our results suggest that this model of SCA3 combines behavioral disease phenotypes with molecular features of SCA3 (*e.g.* intranuclear aggregates). Importantly our results demonstrated a discrete neuronal death and there was no evident gliosis with a relatively slow progression of the disease and a lifespan over 1 year. This suggests that the progressive motor phenotype observed in CMVMJD135 model is primary attributable to dysfunction of the brain regions affected in SCA3 similar to observed in other models and patients. Thus, this animal model may be a good model for studying the pathogenesis and responses to therapy of SCA3 and other polyQ disorders.

In the second part of this section we studied the status of the endocannabinoid signaling system in the transgenic mouse model of SCA3, in particular we analyzed the levels of: endocannabinoids (AEA and 2-AG) and related ligands: oleoylethanolamide (OEA), palmitoylethanolamide (PEA) and 2-oleoylglycerol (2-OG); the two cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂); the endocannabinoid synthetic enzymes (NAPE-PLD and DAGL); and the degrading enzymes (FAAH and MAGL). We put special emphasis in the brain regions particularly affected in this subtype of SCA (cerebellum, brainstem and striatum). First, we measured the levels of endocannabinoids, and related *N*-acylethanolamines and 2-acylglycerols, and we found reductions in anandamide and oleoylethanolamide in the brainstem in earlier stages of the disorder, but not in the others brain regions. These changes correlated with a parallel increase in the expression of the hydrolyzing enzyme FAAH which is also increase in striatum at advanced stage of the disorder. The other hydrolyzing (MAGL) and synthesizing enzymes (NAPE-PLD, DAGL) were not altered. Second, we measured the cannabinoid receptors in SCA3 mice and found an increase in CB₁ receptors in the cerebellum and a decrease in the striatum in the later stages of disease with no changes in CB₂ receptors. In cerebellum, the high immunoreactivity for the CB₁ receptor was detected in terminals of basket cells suggesting the involvement of these changes in the motor symptoms observed in transgenic mice. Lastly, we investigated the possibility of changes in the formation of heteromers of cannabinoid receptors with other receptors. We found CB₁ receptors forming heteromers with CB₂ and with adenosine A_{2A} receptors in the cerebellar cortex (molecular and granular layers), in the pontine nucleus of the brainstem and in striatum of *wildtype* animals but both, CB₁-CB₂ and CB₁-A_{2A} receptor heteromers were strongly reduced in SCA3 mice from intermediate and advanced stage respectively. These results may have a key role in the design of future pharmacological studies.

Our results in SCA-3 mutant mice confirm a significant alteration in the endocannabinoid signaling system in the most important brain structures affected in this type of ataxia, suggesting that the endocannabinoid system could offer biomarkers for identification of disorder, and that a pharmacological manipulation addressed to correct the changes in the endocannabinoid signaling could be a promising option in SCA3, but also in other SCAs caused by the polyQ expansion.

In summary, the **CONCLUSIONS** of this Thesis are:

- 1- The endocannabinoid signaling system is significantly altered in the cerebellum of patients affected of SCAs caused by polyglutamine repeats. These changes observed shown the same type of response (an increase) in all cannabinoid elements analyzed (i.e. the CB₁ and CB₂ receptors and the FAAH and MAGL enzymes).
- 2- These increase in cannabinoids receptors and degrading enzyme observed can be divided into two specific responses: (I) neurons degenerating in the cerebellum of SCA patients; (ii) glial cells in the cerebellum of SCA patients
- 3- Endocannabinod system is altered during SCA3 progression in CMVMJD135 transgenic mice. The changes observed appear in endogens ligands AEA and OEA, CB₁ receptor and FAAH enzyme, which respond differently depending the brain structure and the stage of the disorder analyzed.
- 4- The earlier changes observed in endocannabinoid system in brain of SCA3 mice appear in FAAH enzyme at cerebellum, and brainstem level from the presymptomatic stages of the disorder. In brainstem the increase in FAAH is coupled to a decrease in *N*-acylethanolamines AEA and OEA.
- 5- The later changes observed in endocannabinoid system in brain of SCA3 mice appear in the cerebellum and affected at the CB₁ receptor, Otherwise, the striatum od SCA3 mice at later stages of the disorder show a decrease in the FAAH enzyme
- 6- Cannabinoid receptors form CB₁-CB₂ and CB₁-A_{2A} heteromers in brain of *wildtype* mice.
7. The CB₁-CB₂ and CB₁-A_{2A} heteromers decrease strongly in brain of SCA3 mice in the advanced stages of the disorder

RESUMEN

Las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes (SCAs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas clínica y genéticamente heterogéneas, que se caracterizan por la pérdida de equilibrio y la coordinación motora debido a la disfunción del cerebelo o de sus vías aferentes y eferentes. Como resultado de un proceso degenerativo que a menudo no se limita al cerebelo, sino que se extiende a la retina, el nervio óptico, el tronco cerebral, los ganglios basales, la corteza cerebral, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, estas enfermedades presentan a menudo varios síntomas extra-cerebelosos. Hasta la fecha, se ha identificado el gen y la mutación causante de la enfermedad para 24 tipos de SCA distintos.

De acuerdo al tipo de mutación que se da en estas enfermedades, se pueden distinguir tres grandes grupos: (i) las SCAs causadas por mutaciones convencionales (como delecciones, mutaciones puntuales, duplicaciones o mutaciones con cambio de sentido, entre otras); (ii) las SCAs causadas por expansiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en la región codificante del gen responsable de cada enfermedad; y (iii) las SCAs causadas por expansiones de repeticiones en regiones no codificantes. De los tres tipos de mutaciones descritas, las SCAs más comunes son las que pertenecen a la familia de las enfermedades poliglutaminopatías, que también incluye la enfermedad de Huntington, causada todas ellas por la expansión de repetición CAG en genes específicos que dan lugar a proteínas con un tracto de poliglutamina anormalmente largo. Todas estas enfermedades presentan como característica común, la neurodegeneración progresiva de ciertas subpoblaciones neuronales en diferentes áreas encefálicas y la formación de agregados de proteínas conteniendo fragmentos de poliglutaminas. La neurodegeneración progresiva que se observa en los trastornos polyQ está mediada por proteínas mutantes capaces de inducir daño neuronal y déficits en la neurotransmisión sináptica al interferir con varios procesos celulares y moleculares. Los procesos que se ven afectados son entre otros: la agregación de proteínas, el sistema ubiquitina-proteasoma, la desregulación de la transcripción y expresión génica, alteraciones de la homeostasis del calcio, insuficiencia mitocondrial, excitotoxicidad, estrés oxidativo, eventos inflamatorios locales y activación de las rutas de pro-apoptóticos. Estos mecanismos interactúan y se potencian mutuamente produciendo la acumulación de daño celular que finalmente conduce a la disfunción y, en última instancia, a la muerte de las neuronas a través de múltiples eventos. Estas evidencias han llevado a sugerir que quizás sea necesario tratar simultáneamente distintas dianas moleculares para prevenir la neurodegeneración, conservar la función neuronal y aliviar así los síntomas neurológicos asociados a la enfermedad. Sin embargo, actualmente las SCAs no tienen cura y carecen de un tratamiento eficaz que alivie los síntomas y, en particular, que modifique la progresión de la enfermedad.

En este sentido, durante la última década se han acumulado bastantes evidencias preclínicas que ponen de manifiesto el carácter neuroprotector de compuestos activos sobre el sistema de comunicación endocannabinoide, llamados cannabinoides, un término que incluye a los compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa* L. (por ejemplo el Δ^9 -tetra-hidrocannabinol o Δ^9 -THC, el principal componente activo del *cannabis*), pero también hace referencia a sustancias

sintéticas cannabimiméticas y ciertos lípidos endógenos de señalización. El sistema cannabinoide endógeno es un sistema de señalización lipídica que tiene importantes funciones reguladoras. Se compone de los receptores para cannabinoides, sus ligandos endógenos (los endocannabinoides), las proteínas que intervienen en su síntesis y degradación, así como las proteínas que regulan los niveles de endocannabinoides y la acción de estos sobre los receptores.

Los principales endocannabinoides son pequeñas moléculas derivadas del ácido araquidónico, los dos más estudiados son la anandamida (AEA, N-araquidonoil-etanolamina) y 2-AG (2-araquidonoil-glicerol). Estos ligandos se unen a receptores acoplados a proteína G (GPCR), conocidos como los receptores cannabinoides tipo 1 y tipo 2 (CB₁ y CB₂). Varios estudios han sugerido que los cannabinoides pueden actuar sobre otros receptores celulares, independientes de los receptores CB₁ y CB₂. De manera que existen receptores de acción cannabinoide que incluyen al receptor ionotrópico TRPV1 y algunos receptores huérfanos acoplados a proteínas G (por ejemplo los receptores GPR55 y GPR119). Los endocannabinoides además pueden activar receptores nucleares como ciertos receptores PPAR (peroxisome proliferator activated receptor). Los endocannabinoides, como otras moléculas de señalización lipídicas, son liberados bajo demanda tras un estímulo. Una vez que se activan los receptores cannabinoides los endocannabinoides se transportan al interior de las células mediante un sistema de captación específica y son degradados por dos enzimas bien caracterizadas, la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoacilglicerolipasa (MAGL). Los cannabinoides a través de los receptores cannabinoides activan múltiples vías de transducción de señales intracelulares. La activación con un agonista de los receptores cannabinoides produce la inhibición de la adenilato ciclasa y los canales de calcio dependientes del voltaje, la activación de los canales de potasio, la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), y la activación de la vía de señalización mediada por la proteína PI3K /Akt. Los receptores CB₁ y CB₂ pueden influir además en otras vías de transducción de señales. En los últimos años varios estudios han demostrado que ciertos GPCRs pueden formar heterómeros. Para los receptores de cannabinoides se ha demostrado la existencia de heterómeros entre el receptor CB₁ y los receptores de dopamina, de adenosina, o los receptores opioides, entre otros. Es interesante destacar que el receptor CB₁ es capaz de formar además heterómeros funcionales con otros receptores relacionados con el sistema endocannabinoide (por ejemplo los receptores CB₂ y GPR55). La heteromerización de los receptores GPCRs es clave para la integración de señales extracelulares y en la generación de respuestas de la célula a través de mecanismos adicionales a los clásicamente atribuidos a los receptores cannabinoides individuales.

Mediante la activación de los receptores cannabinoides presentes en el sistema nervioso central (SNC) los endocannabinoides pueden regular varias funciones neuronales. El receptor CB₁ está presente en todo el SNC y es particularmente abundante en las neuronas donde regulan la liberación de neurotransmisores. El receptor CB₂ se encuentra en el SNC de forma principal en las células gliales, regulando su motilidad y función inmunomoduladora, pero también en algunas subpoblaciones de neuronas. El sistema endocannabinoide se ha propuesto como un importante modulador de la función sináptica en el SNC, principalmente debido al control retrógrado de las sinapsis excitatorias e inhibitorias, que permite a este sistema participar en el control de importantes procesos neurobiológicos en condiciones saludables. Sin embargo, esta relevancia fisiológica adquiere un mayor interés en condiciones neuropatológicas que afectan ya sea a la función o a las estructuras de áreas específicas del cerebro. Estas condiciones patológicas se han asociado con importantes cambios en la actividad de este sistema modulador (es decir, ligandos,

receptores, enzimas del SCE). Estas alteraciones son frecuentemente déficits pero también se han visto incrementos y afectan a elementos específicos de este sistema de comunicación. Se han encontrado incluso en fases tempranas y presintomáticas de estos trastornos, y se han caracterizado en modelos experimentales y, en menor medida, en sujetos humanos. Estos cambios en elementos clave de la señalización cannabinoide podrían desempeñar un papel fundamental en la patogénesis, presumiblemente al agravar la lesión neuronal, aunque, en algunos casos, estas alteraciones se han interpretado como parte de una respuesta protectora endógena contra el daño cerebral.

Los cannabinoides han sido propuestos como moléculas neuroprotectoras muy prometedoras en base a la capacidad de estos compuestos de: (i) regular los niveles del glutamato; (ii) reducir los fenómenos de excitotoxicidad; (iii) reducir los niveles intracelulares de calcio y la posterior activación de las vías destructivas dependientes de calcio; (iv) reducir la generación de intermediarios reactivos de oxígeno limitando su toxicidad; (v) disminuir los acontecimientos inflamatorios locales actuando sobre los procesos gliales; y (vi) los cannabinoides también son capaces de actuar a nivel de la supervivencia neuronal mediante la regulación de la producción de factores tróficos, entre otros. A través de uno o más de estos procesos, los cannabinoides han proporcionado evidencias neuroprotectoras en varios modelos animales de diferentes trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson y la corea de Huntington. Ambos trastornos con un importante componente neurodegenerativo similar al que se ha observado en las SCAs. Estas propiedades de los cannabinoides proporcionan dianas para el desarrollo de nuevas terapias neuroprotectoras.

En este contexto, la principal **HIPÓTESIS** de trabajo de esta Tesis es que el sistema endocannabinoide y su posible desregulación en las SCAs proporciona elementos importantes para una mayor comprensión de la progresión de estas enfermedades, así como para el diseño de potenciales tratamientos farmacológicos asociados a estos cambios. Que los cannabinoides puedan inducir neuroprotección en las SCAs, como lo han hecho en varios modelos preclínicos de otras enfermedades neurodegenerativas, no es la única cuestión que requiere de experimentación en estas enfermedades. Antes de esto, es necesario identificar el tipo de cambios que el desarrollo de la degeneración cerebelosa en las SCAs produce en elementos específicos del sistema de señalización endocannabinoide. En este sentido, conocer los cambios en elementos de este sistema de señalización, como los receptores cannabinoides, sus ligandos o las proteínas responsables de regular su disponibilidad, es absolutamente necesario, ya que estos elementos son objetivos potenciales para una acción farmacológica con cannabinoides en las SCAs, y esto debería ayudar a un mejor diseño de una potencial terapia para detener y/o retrasar la progresión de la degeneración cerebelosa, como se ha seguido en otros trastornos neurodegenerativos.

En este contexto, los **OBJETIVOS** específicos de esta Tesis Doctoral son:

1. Estudiar el estado del sistema cannabinoide endógeno en muestras *post mortem* de cerebelo de pacientes afectados por algún tipo de SCA.

2. Identificar las posibles alteraciones que ocurren en los diversos elementos de SCE en las regiones cerebrales afectadas durante el progreso de la enfermedad en un modelo animal de la SCA3, la forma más prevalente de SCA en todo el mundo.

Los **RESULTADOS** obtenidos en esta tesis se han abordado a lo largo de dos diseños experimentales, el primero de ellos relacionado con los estudios en muestras humanas de pacientes afectados por algún tipo de SCA, el segundo de ellos con los estudios del sistema endocannabinoide en un modelo de ratón de SCA3.

En la primera parte del **DISEÑO EXPERIMENTAL I** hemos determinado mediante métodos inmunohistoquímicos la presencia de signos histopatológicos de disfunción / degeneración en las muestras *post mortem* de cerebelo de pacientes afectados por diferentes tipos de SCA poliglutamínicas. En primer lugar, se analiza el daño neuronal utilizando dos marcadores neuronales, calbindina, un marcador de células de Purkinje y enolasa neuronal específica (NSE) un marcador de varias neuronas, en este caso, de las neuronas del núcleo dentado del cerebelo. También se analiza la respuesta glial en el cerebelo de los pacientes afectados de SCA, mediante el uso de dos marcadores comunes para este tipo de células: el marcador microglial Iba-1, y GFAP, marcador de astrocitos. Hemos descrito que las muestras de cerebelo proporcionadas por un Biobanco presentan pérdidas importantes de las células de Purkinje, así como de otras subpoblaciones neuronales del cerebelo, también se ha observado una marcada microgliosis y astrogliosis en la sustancia blanca y la corteza cerebelosa de los tejidos SCA en comparación con los tejidos sanos. Estos hallazgos apoyan la validez de nuestro enfoque experimental y el uso de estos tejidos para analizar el sistema endocannabinode en el cerebelo afectado por SCA.

En la segunda parte de este diseño experimental, hemos estudiado el estado del sistema endocannabinoide en el cerebelo *post mortem* de pacientes afectados por algún tipo de SCA. Para lograr este objetivo, se llevan a cabo experimentos de inmunohistoquímica mediante los que se analiza el patrón de distribución de los dos receptores cannabinoides, CB₁ y CB₂, y de las enzimas de degradación de endocannabinoides, FAAH y MAGL. Para establecer la localización celular de los elementos del sistema endocannabinoide que aparecen alterados en el cerebelo de los pacientes de SCA realizamos técnicas de doble marcaje utilizando los marcadores celulares específicos anteriormente mencionados, así como el marcador de macrófagos/microglía, CD68.

Hemos demostrado que el sistema endocannabinoide se altera significativamente en el cerebelo *post mortem* de pacientes de SCA en comparación con sujetos control. Se observa un aumento en la inmunorreactividad para el receptor CB₁ y CB₂, y para las enzimas FAAH y MAGL en el cerebelo de los pacientes de SCA que se hace evidente en la corteza cerebelosa (capa granular y capa de células de Purkinje), pero también en otras partes del cerebelo (materia blanca y núcleo dentado). Los experimentos de doble inmunofluorescencia muestran que el incremento de los receptores CB₁ se localiza en las células de Purkinje, también en astrocitos, microglía reactiva y macrófagos de la sustancia blanca cerebelosa. El receptor CB₂ se localiza en las células de Purkinje, glía de Bergmann, astrocitos y microglía de la sustancia blanca cerebelosa. Las enzimas de degradación FAAH y MAGL se localiza en las células de Purkinje y también en astrocitos de la sustancia blanca del cerebelo. La identificación de los diversos elementos del sistema endocannabinoide en las neuronas de Purkinje, que son las principales células afectadas en SCAs, así como en elementos gliales demuestra que el sistema endocannabinoide se altera

significativamente en el cerebelo de los pacientes SCA. Los cambios observados en el sistema endocannabinoide en las células gliales sugieren ser parte de una respuesta protectora endógena y pueden servir para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas basadas en la activación de estos receptores cannabinoides con el objetivo de controlar la influencia glial en las neuronas del cerebelo. La identificación de varios elementos del sistema endocannabinoide en las neuronas de Purkinje, que son las principales células afectadas en SCAs, así como los cambios observados en estos elementos en los tejidos de pacientes de SCA, sugieren que las alteraciones en este sistema neuromodulador pueden estar relacionados con la patogénesis de la SCA. Este resultado apoya la idea de que el sistema endocannabinoide podría ser una posible diana terapéutica para el tratamiento de las SCAs.

En el **DISEÑO EXPERIMENTAL II**, se determina la progresión de la enfermedad en un nuevo modelo de SCA, en particular, se utiliza un modelo de SCA3, el subtipo más frecuente de SCA en todo el mundo.

Para estos estudios se hicieron dos tipos de aproximaciones experimentales: (i) la primera aproximación fue caracterizar la progresión de los déficits neurológicos en estos ratones utilizando diferentes pruebas de comportamiento relacionados con la coordinación motora (Rotarod, *Hanging Wire*, Barra de equilibrio, *Clasping* y test de la huella) y se analiza también las alteraciones en la actividad metabólica cerebral mediante la técnica de imagen de Tomografía por Emisión de Positrones. Con estos datos neurológicos, definimos tres etapas diferentes para la progresión de la enfermedad: una etapa sintomática temprana (16 semanas de edad), una fase sintomática estable (32 semanas) y una etapa avanzada (56 semanas); (ii) el segundo enfoque experimental consiste en analizar los signos neuropatológicos de la disfunción o la degeneración en las regiones cerebrales afectadas en SCA3 en las tres etapas de la enfermedad (15, 31 y 56 semanas). Para este propósito se realizan diferentes métodos histológicos utilizando tanto la tinción de azul de metileno como la inmunohistoquímica para varios marcadores: calbindina (células de Purkinje), Iba-1 (microglía), GFAP (astrocitos) y ubiquitina. También se analizan por métodos bioquímicos (*Western-blot*, qRT-PCR) varios marcadores relacionados con la patogenia de la SCA3 y comúnmente utilizados para evaluar el grado de neurodegeneración: ataxina-3; calbindina; NSE; marcador de neuronas de proyección estriatal, el principal subtipo de neuronas en el cuerpo estriado (DARPP32); transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST; citoquinas TNF- α y β -IL1; y el factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF).

Nuestros resultados sugieren que este modelo de SCA3 combina características fenotípicas y moleculares de la SCA3. Es importante destacar que nuestros resultados demuestran una gliosis y una muerte neuronal discretas acompañadas de una progresión relativamente lenta de la enfermedad y una vida útil de estos animales de más de 1 año. Esto sugiere que el fenotipo motor progresivo observado en el modelo CMVMJD135 es primariamente atribuible a la disfunción de las regiones cerebrales afectadas en SCA3 sin presentar un importante componente inflamatorio. Por lo tanto, este modelo animal presenta muchas características fenotípicas y patológicas de la SCA3. Sugiriendo que es un buen modelo para el estudio de la patogénesis y de la respuesta a terapias en la SCA3, así como otros trastornos polyQ.

En la segunda parte de este diseño experimental se estudia el estado del sistema de señalización endocannabinoide en un modelo de ratón transgénico de SCA3, en particular, se analizan los niveles de: (i) endocannabinoides (AEA y 2-AG) y ligandos relacionados:

oleoiletanolamida (OEA), palmitoiletanolamida (PEA) y 2-oleoylglycerol (2-OG); (ii) receptores cannabinoides (CB₁ y CB₂); (iii) enzimas de síntesis de endocannabinoides (NAPE-PLD y DAGL); y (iii) enzimas de degradación de endocannabinoides (FAAH y MAGL). El estudio es principalmente en aquellas regiones del cerebro especialmente afectadas en este subtipo de SCA (cerebelo, tronco cerebral y estriado). En primer lugar, medimos los niveles de endocannabinoides, y N-aciletanolaminas relacionadas y 2-acilgliceroles, y encontramos una reducción en los niveles de AEA y OEA en el tronco encefálico de los ratones transgénicos en comparación con los *wildtype* en las fases temprana e intermedia de la enfermedad, pero no se observan cambios en estos ligandos en las demás regiones del encéfalo estudiadas a ninguna de las edades analizadas. Estos cambios en los niveles de los ligandos cannabinoides en el tronco encefálico están en consonancia con el aumento en la expresión de la enzima FAAH que observamos en esta estructura y a esa edad. En contraste, en la fase más avanzada de la enfermedad se observa un incremento de la enzima FAAH en el cuerpo estriado de los tejidos de SCA al comparar con los controles. El otro enzima de degradación estudiada (la enzima MAGL), y las enzimas de síntesis que sintetizan endocannabinoides (NAPE-PLD, DAGL) no se ven alteradas. En segundo lugar, el análisis de los receptores cannabinoides en los ratones SCA-3 muestra un aumento de los niveles del receptor CB₁ en el cerebelo y una disminución de dicho receptor en el estriado en las etapas tardías de la enfermedad y sin cambios aparentes en los niveles del receptor CB₂. En el cerebelo, el incremento de inmunoreactividad para el receptor CB₁ se localiza en las terminales de las células en cesto sugiriendo la participación de estos cambios en los síntomas motores observados en los ratones transgénicos.

Por último, se determinan los posibles cambios que se dan en la formación de heterómeros de los receptores cannabinoides con otros receptores de tipo GPCR. En particular, hemos encontrado que los receptores CB₁ forman heterómeros con los receptores CB₂ y con los receptores de adenosina A_{2A} en la corteza cerebelosa (capas moleculares y granulares), en el núcleo pontino del tronco encefálico y en el cuerpo estriado de los animales *wildtype*, pero ambos heterómeros, CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A}, se encuentran altamente reducidos en el cerebro de los ratones SCA3 en la fase intermedia y avanzada, respectivamente. Estos resultados pueden tener una influencia importante en el diseño de futuro estudios farmacológicos.

Nuestros estudios en los ratones transgénicos SCA3 confirman una alteración significativa en el sistema de señalización endocannabinoide en las estructuras encefálicas más importantes afectadas en este tipo de ataxia, lo que sugiere que la manipulación farmacológica dirigida a corregir los cambios en la señalización endocannabinoide podría ser una opción prometedora en la SCA3, así como en otras SCAs causados por la expansión polyQ.

En resumen, las conclusiones de esta tesis son:

1. El sistema de señalización endocannabinoide se altera significativamente en el cerebelo de los pacientes afectados por algún tipo de SCA causada por repeticiones poliglutaminas. Los cambios observados muestran el mismo tipo de respuesta (aumento) en todos los elementos cannabinoides analizados (es decir, los receptores CB₁ y CB₂ y las enzimas FAAH y MAGL).

2. Este aumento en la expresión de los receptores para cannabinoides y de las enzimas de degradación de endocannabinoides se puede dividir en dos respuestas específicas: (i) las neuronas que degeneran en el cerebelo de los pacientes de SCA, (ii) en células gliales del cerebelo de los pacientes SCA.
3. El sistema endocannabinoide se ve alterado durante la progresión de la SCA3 en los ratones transgénicos CMVMJD135. Los cambios observados aparecen en las *N*-aciletanolaminas AEA y OEA, y sobre todo, en el receptor CB₁ y la enzima FAAH, unos cambios que se presentan de forma diferencial dependiendo de la estructura del cerebro y la etapa de la enfermedad analizada.
4. Los cambios tempranos observados en el sistema endocannabinoide en el cerebro de los ratones SCA3 aparecen en la enzima FAAH en cerebelo, tronco cerebral y a nivel de las etapas tempranas de la enfermedad. En el tronco cerebral, el incremento de la enzima FAAH se acopla a una disminución en las *N*-aciletanolaminas AEA y OEA.
5. Los cambios tardíos observados en el sistema endocannabinoide en el cerebro de los ratones SCA3 afectan al receptor CB₁, el cual aparece incrementado en el cerebelo. En el estriado, en las etapas avanzadas de la enfermedad, se observa por el contrario un descenso de inmunorreactividad para el receptor CB₁. En esta estructura (el estriado) y a esta edad se observa en cambio un aumento en los niveles de la enzima FAAH.
6. Los receptores cannabinoides CB₁ forman heterómeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} en el cerebro de los ratones *wildtype*.
7. La formación de heterómeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} disminuyen de manera drástica en el cerebro de ratones SCA3 en las etapas avanzadas de la enfermedad

I. INTRODUCCIÓN

1. ATAXIAS CEREBELOSAS

Las ataxias cerebelosas son un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas que presentan como característica principal la ataxia. Ataxia es un término griego que significa “falta de orden” y en clínica hace referencia a un trastorno de la coordinación de los movimientos que se manifiesta como una falta de equilibrio (principalmente al caminar), descoordinación de las extremidades superiores y deterioro en el control de otros movimientos voluntarios como son los movimientos oculares o los movimientos de los músculos que intervienen en el habla (Seidel et al., 2012).

La ataxia aparece como síntoma en multitud de enfermedades distintas y generalmente se produce debido a un mal funcionamiento del cerebelo (Seidel et al., 2012). En el caso de las ataxias cerebelosas, la ataxia es consecuencia de una lesión específica en el cerebelo y en sus vías aferentes y eferentes. Según su etiología las ataxias cerebelosas se pueden clasificar en hereditarias o adquiridas (causas vasculares, expansivas, traumáticas, infecciosas, tóxicas, metabólicas, etc). Las ataxias hereditarias son las más comunes y por lo tanto las más estudiadas, dentro de este grupo se pueden encontrar las ataxias autosómicas dominantes, las ataxias autosómicas recesivas y las ataxias ligadas al cromosoma X (Seidel et al., 2012). En la presente tesis doctoral nos hemos interesado en un tipo de ataxias autosómicas dominantes, las ataxias espinocerebelosas.

1.1. Ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes

Las ataxias espinocerebelosas son un grupo heterogéneo de trastornos neurológicos de herencia autosómica dominante e inicio tardío que, por su prevalencia, se engloban dentro del grupo de las llamadas enfermedades raras. Aunque la ataxia es el signo clínico característico, son pocas las ataxias espinocerebelosas que presentan un síndrome cerebeloso casi puro, observándose en la mayoría de los casos la afectación de otras áreas como el tronco, la médula espinal, el hipotálamo, el tálamo, los ganglios basales, la corteza cerebral, el sistema nervioso periférico o la retina (Seidel et al., 2012). Esta múltiple afectación se traduce en la presencia de características clínicas muy variables. Así, los pacientes, además de ataxia progresiva pueden presentar un gran número de síntomas adicionales como pérdida de masa muscular, trastornos oculares, síntomas extrapiramidales, alteración en la articulación de las palabras (disartria), dificultad para tragar (disfagia) y respirar, además de alteraciones psiquiátricas y cognitivas como depresión y demencia (Manto, 2005; Marmolino y Manto, 2010).

Debido a la heterogeneidad fenotípica que existe, estas enfermedades han sido históricamente difíciles de clasificar. Inicialmente se clasificaron de acuerdo a los hallazgos histopatológicos en tres grupos: (1) la atrofia de afectación predominantemente cerebelosa, (2) la atrofia de afectación predominantemente espinal y (3) la atrofia de afectación espino-cerebelosa

(Greenfield, 1954). Posteriormente, Harding propuso una clasificación de estas enfermedades en base a sus características clínicas (Harding, 1983, 1993). Esta clasificación se utiliza ampliamente en la práctica clínica y clasifica a las ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (ADCA, del inglés *autosomal dominant cerebellar ataxia*) en tres categorías: ADCA tipo I, que consiste en un síndrome cerebeloso acompañado de forma variable por otras disfunciones del sistema nervioso; ADCA tipo II, caracterizada por un síndrome cerebeloso acompañado de retinopatía pigmentaria y ADCA tipo III, que es un síndrome cerebeloso puro. Aunque esta clasificación aún se utiliza en la práctica clínica, actualmente, la clasificación más aceptada por la comunidad científica está basada en el análisis genético-molecular (Matilla-Dueñas et al., 2014). En esta clasificación cada tipo diferente de enfermedad se nombra con la abreviación SCA (del inglés *spinocerebellar ataxia*) seguida del número arábigo correspondiente al número de locus descrito para cada tipo.

En la actualidad se conocen 38 tipos de SCA distintas, aunque sólo en 24 de ellas se ha identificado el gen y la mutación causante de la enfermedad (Tabla 4) (Matilla-Dueñas et al., 2014). De acuerdo al tipo de mutación que se da en estas enfermedades, se pueden distinguir tres grandes grupos: (i) las SCAs causadas por expansiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en la región codificante del gen responsable de cada enfermedad; (ii) las SCAs causadas por expansiones de repeticiones en regiones no codificantes y (iii) las SCAs causadas por mutaciones convencionales (como deleciones, mutaciones puntuales, duplicaciones o mutaciones con cambio de sentido, entre otras). De los tres tipos de mutaciones descritas, la expansión del triplete CAG es la más común. La presencia de esta mutación en la secuencia de ciertos genes se traduce en la expresión de proteínas con un dominio de repeticiones de glutamina en el extremo *N*-terminal. Esta cadena anormal de poliglutamina (poliQ) confiere propiedades tóxicas a la proteína respectiva, causando como efecto final la muerte celular de poblaciones neuronales específicas. Aquellas que resultan ser más sensibles a la mutación por causas en muchos casos aún desconocidas (Matilla-Dueñas et al., 2014).

La progresión de las enfermedades causadas por la repetición de glutaminas se diferencia claramente del resto de SCAs. En el caso de las enfermedades de poliQ se observa un cuadro clínico más severo e incapacitante que contrasta con un curso lentamente progresivo, a pesar de un inicio más temprano, y una mejor calidad de vida de las SCAs que son causadas por otro tipo de mutaciones (Durr, 2010). Las SCAs causadas por la presencia de poliQ, además de ser las formas más graves y prevalentes de SCA, presentan varios rasgos histopatológicos y fisiopatológicos comunes entre ellas pero también con otras enfermedades neurodegenerativas. Entre los mecanismos comunes en estas patologías destacan la progresiva atrofia y muerte selectiva de determinadas poblaciones neuronales a la que contribuyen procesos de excitotoxicidad, estrés oxidativo o inflamación, entre otros (Matilla-Dueñas et al., 2010). En los siguientes puntos de esta tesis doctoral cuando utilicemos el término de SCAs nos referimos a las causadas por la mutación que concurre con la aparición de poliQ.

Tabla 1. Subtipos de ataxias espinocerebelosas.

Subtipo SCA	Mutación	Locus	Producto del gen (proteína)	Subtipo ADCA
SCA 1	(CAG)n	6p	ATXN 1	ADCA tipo 1
SCA 2	(CAG)n	12q	ATXN 2	ADCA tipo 1
SCA 3	(CAG)n	14q	ATXN 3	ADCA tipo 1
SCA 4		16q		ADCA tipo 1
SCA 5	Delección Mutación con cambio de sentido	11p	SPTBN	ADCA tipo 3
SCA 6	(CAG)n	19p	CACNA1A	ADCA tipo 3
SCA 7	(CAG)n	3p	ATXN 7	ADCA tipo 2
SCA 8	(CTG)n	13q	KLHL-1	ADCA tipo 1
SCA 10	(ATTCT)n	22q	ATXN 10	ADCA tipo 1
SCA 11	Cambio de marco de lectura	15q	TTBK2	ADCA tipo 3
SCA 12	(CAG)n	5q	PP2A-2R2B	ADCA tipo 1
SCA 13	Mutación puntual	19q	KCNC3	ADCA tipo 1
SCA 14	Mutación puntual	19q	PKC- γ	ADCA tipo 1
SCA 15/16 (a)	Delección	3p	ITPR	ADCA tipo 3
SCA 17	(CAG)n	6q	TBP	ADCA tipo 1
SCA 18		7q		ADCA tipo 1
SCA 19/22 (b)	Mutación puntual	1p	KCND3	ADCA tipo 1
SCA 20	Duplicación	11q		ADCA tipo 1
SCA 21		7p		ADCA tipo 1
SCA 23	Mutación puntual	20p		ADCA tipo 1
SCA 25		2p		ADCA tipo 1
SCA 26		19p		ADCA tipo 3
SCA 27	Mutación con cambio de sentido	13q	FGF14	ADCA tipo 1
SCA 28	Mutación con cambio de sentido	18p	AFG3L2	ADCA tipo 1
SCA 29		3p		ADCA tipo 1
SCA30		4q		ADCA tipo 3
SCA31	(TGGAA)n	16q		ADCA tipo 3
SCA32		7q		ADCA tipo 1
SCA34		16p		ADCA tipo 1
SCA35	Mutación puntual	20p	TGM6	ADCA tipo 1
SCA36	(GGCCTG)n	20p	NOP56	ADCA tipo 1
DRPLA	(CAG)n	12p	ATN 1	ADCA tipo 1

ADCA, Ataxia autosómica dominante; ATXN 1, ataxina-1; ATXN 2, ataxina-2; ATXN 3, ataxina-3; SPTBN, espectrina β -III; CACNA1A, subunidad del canal de calcio tipo P/Q; ATXN 7, ataxina-7; KLHL-1, proteína de unión a actina; ATXN 10, ataxina-10; TTBK2, quinasa tau tubulina-2; PP2A-2R2B, fosfatasa 2A subunidad β reguladora; KCNC3, canal de potasio familia C; PKC- γ , proteína quinasa C- γ ; ITPR, receptor IP3; TBP, proteína de unión a caja TATA; KCND3, canal potasio familia D; FGF14, factor 14 de crecimiento de fibroblastos; AFG3L2, ATPasa mitocondrial; TGM6, transglutaminasa 6; NOP56 ribonucleoproteína 56; ATN 1, atropina 1. Las pruebas genéticas han demostrado que los pacientes originalmente clasificadas en SCA15 y SCA16 (a) y en SCA19 Y SCA22 (b) son el mismo subtipo de SCA. Tabla adaptada de Matilla-Dueñas et al. (2014).

1.2. Ataxias espinocerebelosas causadas por la expansión de poliglutaminas

Existen siete subtipos de ataxias espinocerebelosas, incluidas las SCAs 1, 2, 3, 6, 7, 17 y la Atrofia Dentado-Rubro-Pálido Luysiana (DRPLA), que están causadas por la presencia de fragmentos anormalmente largos de poliQ en ciertas proteínas, llamadas en su mayoría ataxinas (Zoghbi y Orr, 2000). Estas enfermedades, junto con la enfermedad de Huntington, constituyen el grupo de las llamadas enfermedades poliglutaminicas.

Las funciones de las proteínas que sufren estas mutaciones en las SCAs son muy variadas: las hay que participan en el metabolismo del ARN, otras constituyen canales iónicos o se unen al ADN, etc (Tabla 2) (Matilla-Dueñas et al., 2014). Aunque no se conoce el mecanismo concreto por el cual las repeticiones de poliQ causan la enfermedad, se ha postulado que, posiblemente, la mutación altere la función normal de la proteína, genere inclusiones que causan desregulación transcripcional, produzca trastornos del metabolismo celular y/o interfiera en otras funciones celulares, causando una cadena de acontecimientos que en último lugar producen la muerte neuronal (Matilla-Dueñas et al., 2010, 2014).

Tabla 2. Clasificación de las SCAs poliglutaminicas.

Subtipo SCA	Proteína	Función	Número repeticiones normales	Número repeticiones patológicas
SCA 1	ataxina 1	Regulación de la transcripción	16–44	>39
SCA 2	ataxina 2	Metabolismo del ARN	15–31	>36
SCA 3	ataxina 3	De-Ubiquitinización Regulación de la transcripción	12–40	>55
SCA 6	CACNA1A	Señalización por Ca ²⁺	4–18	>21
SCA 7	ataxina 7	Regulación de la transcripción	4–35	>37
SCA 17	proteína de unión a la caja TATA	Transcripción	25–42	>47
DRPLA	atropina 1	Represión de la transcripción	6–35	>49

CACNA1A, subunidad del canal de calcio tipo P/Q; TATA, secuencia de ADN en la región promotora de genes eucariotas y arqueobacterias.

En las SCAs causadas por la expansión del triplete CAG, existe una relación directa entre el número de repeticiones y la severidad e inicio de la enfermedad, como pasa en el caso de la enfermedad de Huntington que es la principal enfermedad poliglutaminica. Por lo general, por encima de 40 repeticiones CAG, la proteína mutada causará la enfermedad (Tabla 2), y a mayor número de repeticiones mayor severidad, variabilidad y anticipación de los síntomas. Los primeros síntomas asociados a la enfermedad normalmente aparecen entre los 30 y 40 años, aunque también se han detectado algunas formas con inicio temprano, en la niñez, y con inicio tardío, por encima de los 60 años (Craig et al., 2004).

Las SCAs son consideradas enfermedades raras presentando una prevalencia entre 0.2 y 0.3 casos por cada 100.000 individuos. Esta prevalencia es variable y depende de factores geográficos, étnicos y del llamado efecto fundador. A nivel mundial, la ataxia espinocerebelosa de tipo 3, también conocida como enfermedad de Machado-Joseph (MJD: del inglés *Machado Joseph disease*), es la SCA más frecuente en la mayoría de poblaciones (Schöls et al., 2004).

1.2.1. Características clínicas de las ataxias espinocerebelosas poliglutamínicas

Aunque existen algunas diferencias entre los distintos tipos de SCAs, en general, estas enfermedades comienzan con trastornos en la marcha que en ocasiones se acompaña de dificultades leves en el habla, movimientos sacádicos irregulares y disfagia. A medida que la enfermedad avanza, los problemas oculomotores se hacen más evidentes. La ataxia y disartria se van haciendo progresivamente más severas y se observan síntomas de disfunción cerebelar como la hiperreflexia, pérdida de tono muscular (hipotonía) y la dismetría o ejecución de los movimientos sin medida en el tiempo ni en el espacio. En las fases avanzadas de la enfermedad se observa atrofia muscular y rigidez (bradiquinesia), falta de reflejos en los tendones, distonía (contracciones sostenidas de músculos en una o más partes del cuerpo) y corea (temblores involuntarios). También en las fases finales se puede producir pérdida cognitiva y frecuentemente se da una fuerte disfunción bulbar, que conlleva una disfagia severa. Los pacientes fallecen normalmente por complicaciones secundarias como por ejemplo fallo respiratorio, infecciones o infarto (Jacobi et al., 2013; Matilla-Dueñas, 2012; Rüb et al., 2013).

1.2.2. Neuropatología de las ataxias espinocerebelosas poliglutamínicas

Desde un punto de vista neuropatológico, en general, las SCAs causadas por una expansión de poliQ están caracterizadas por la atrofia del cerebelo, tronco encefálico y medula espinal. Además, se ha visto que pueden verse afectadas otras regiones cerebrales como ganglios basales, tálamo y ocasionalmente la corteza cerebral. En el caso de la SCA7 se observa también alteraciones en la retina (Döhlinger et al., 2008; Seidel et al., 2012; Taroni and DiDonato, 2004). En la Figura 1 se muestra un esquema de las principales regiones afectadas en cada una de las SCAs.

Microscópicamente, en estas enfermedades la principal característica del proceso neurodegenerativo es la pérdida neuronal que afecta a los circuitos en los que participan la corteza cerebelosa, los núcleos profundos y núcleos del tronco cerebral (Figura 1). La pérdida neuronal es selectiva y en el cerebelo afecta principalmente a las células de Purkinje y a las neuronas del núcleo dentado. Esta pérdida neuronal se acompaña de lesiones características como las formaciones en forma de torpedo (torpedos axonales) o cestas vacías (conocidas como *empty baskets*). En el tronco cerebral los núcleos que resultan afectados son principalmente la oliva inferior y el núcleo pontino. La interrupción de los circuitos cerebelosos contribuye de manera fundamental en la aparición de los síntomas asociados a estas enfermedades como son los desórdenes en la ejecución de movimientos precisos, equilibrio, o aprendizaje motor (Koeppen, 2005; Manto, 2005).

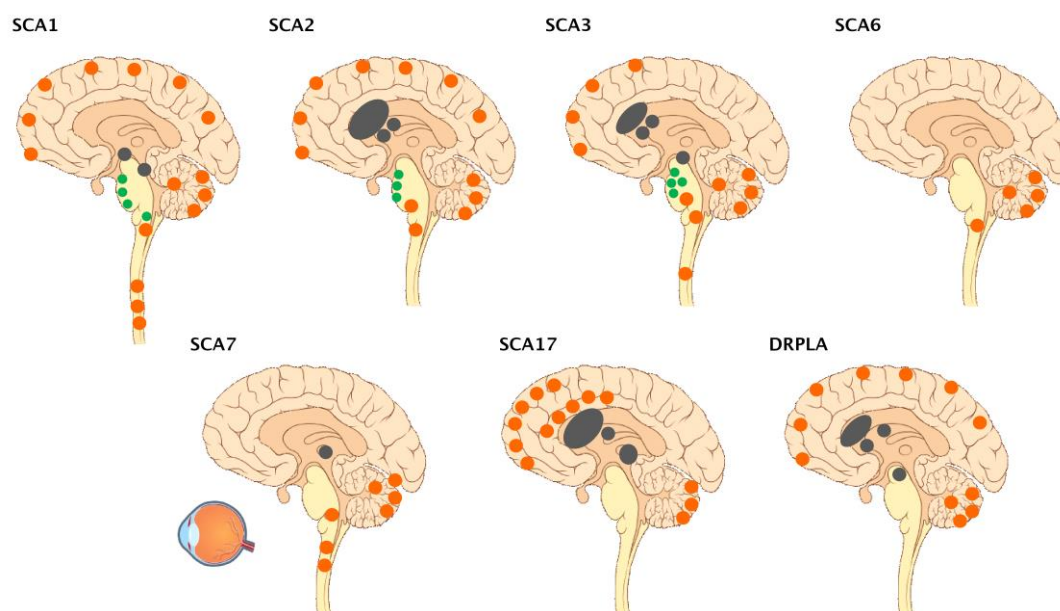


Figura 1. Principales regiones afectadas en las SCAs. Los puntos naranjas representan las zonas donde se observa **pérdida neuronal**. Los puntos grises indican la afectación de los núcleos extrapiramidales. Los puntos verdes indican afectación de los nervios de los pares craneales. En la SCA7 se observa, además, degeneración de la retina. Imagen adaptada de Taroni y DiDonato, 2004.

En las SCAs también aparece una pérdida de fibras nerviosas sobre todo en los cordones posteriores y posterolaterales medulares y en la sustancia blanca cerebelosa (Koeppen, 2005). Por último, en estas enfermedades se observa gliosis, en mayor o menor grado, en las zonas lesionadas (Rüb et al., 2013). La aparición de procesos de gliosis indica que durante el progreso de la enfermedad y, seguramente de forma paralela a la pérdida neuronal, tienen lugar procesos inflamatorios que posiblemente contribuyen al proceso degenerativo.

Cuadro 1: CEREBELO

El **cerebelo** es una estructura del encéfalo importante para la correcta ejecución de los movimientos voluntarios, regulación del tono muscular, coordinación de movimientos y control del equilibrio. Esto lo hace integrando las vías sensitivas y las vías motoras: el cerebelo modula las órdenes que la corteza cerebral manda al aparato locomotor, mediante la evaluación de las diferencias entre el movimiento previsto y el real, permitiendo así la realización de movimientos coordinados y precisos.

Histológicamente el cerebelo está formado por sustancia gris y por sustancia blanca. La sustancia gris se dispone en la superficie, donde forma la corteza cerebelosa, y en el interior, donde constituye los núcleos profundos. La sustancia blanca se localiza en la parte interna, envolviendo por completo a los núcleos profundos. Una característica de la corteza cerebelosa es la presencia de un gran número de circunvoluciones paralelas a la línea media. Estos pliegues, denominados **folias cerebelosas**, se caracterizan por presentar un patrón regular de distribución celular (Figura A). En cada una de las folias podemos distinguir un fragmento de sustancia blanca que aparece envuelta por la corteza cerebelosa (sustancia blanca subcortical).

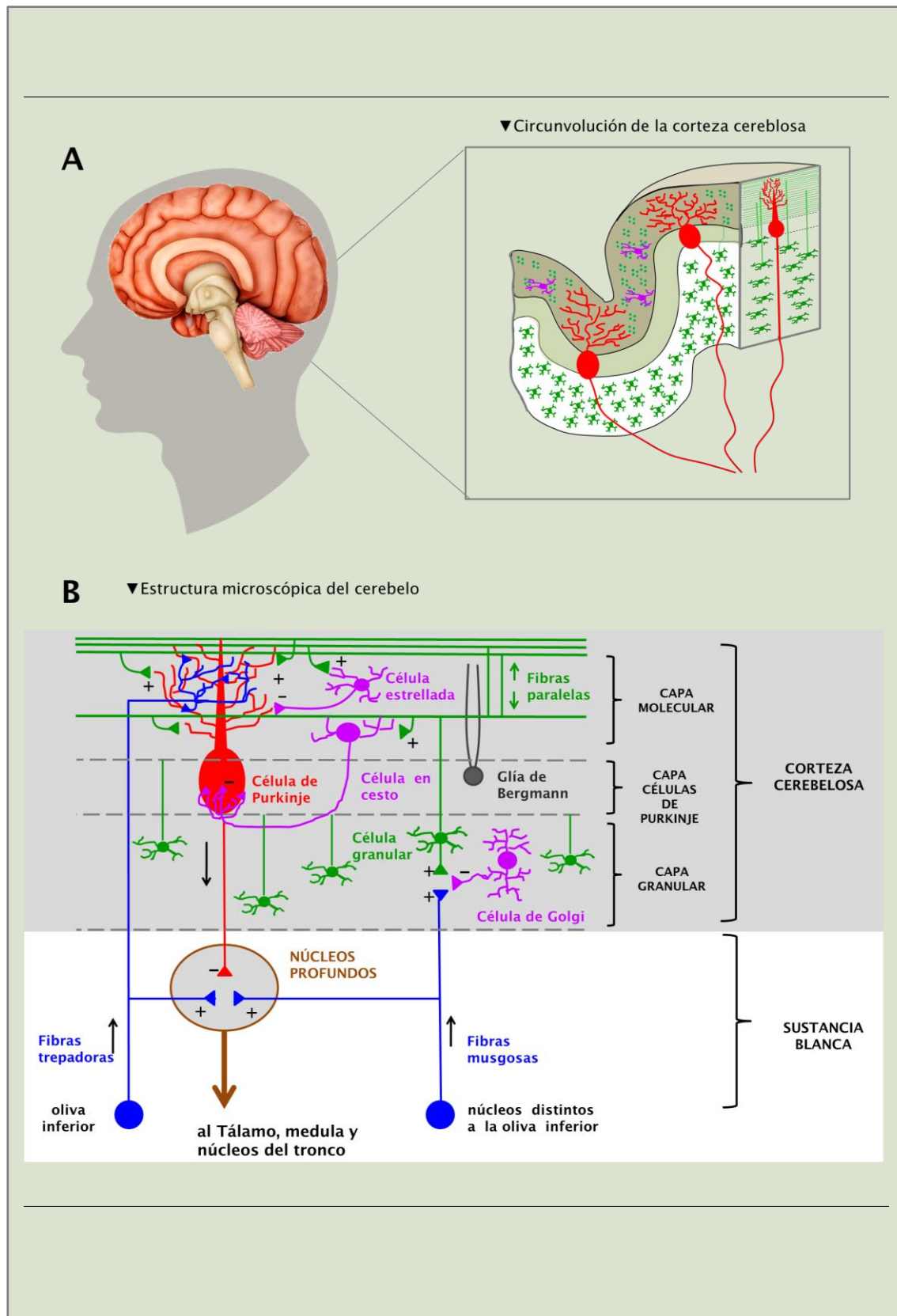
A nivel microscópico la corteza cerebelosa está organizada en tres capas: la granular (más interna), una monocapa de células de Purkinje (intermedia) y la molecular (más externa) (Figura B). La **célula de Purkinje** es el elemento neuronal fundamental en el cerebelo. Estas células bipolares están provistas de un gran árbol dendrítico, que se arboriza en la capa molecular, y de un axón, que atraviesa la capa granular y se dirige hacia los núcleos profundos del cerebelo, siendo las únicas neuronas eferentes de la corteza del cerebelo. Funcionalmente las células de Purkinje son inhibitorias y utilizan GABA como neurotransmisor.

Existen dos tipos de fibras aferentes que transmiten información al cerebelo, por un lado las fibras musgosas, que son los axones procedentes de neuronas de numerosas áreas del sistema nervioso como la médula espinal y ciertos núcleos del Puente de Varolio (como el núcleo pontino), y por otro las fibras trepadoras, que corresponden a los axones de las neuronas de proyección del núcleo de la oliva inferior (en el bulbo raquídeo).

Estas fibras aferentes alcanzan la corteza cerebelosa y a su vez emiten proyecciones colaterales de tipo excitatorio hacia los núcleos profundos. En la corteza, estas fibras excitatorias estimulan las células de Purkinje mediante dos vías: (i) vía directa: a través de las fibras trepadoras, que producen una estimulación directa y muy específica de las células de Purkinje y (ii) vía indirecta: mediante las fibras musgosas, que van a requerir la participación de unas interneuronas excitatorias, las células granulares. En la corteza cerebelosa existen, además, interneuronas de tipo inhibitorio (las células en cesto, las células estrelladas y las células de Golgi) que van a interactuar con las células de Purkinje tanto de forma directa como indirecta.

La información recibida en el cerebelo es por tanto procesada en los circuitos intrínsecos de la corteza cerebelosa y enviada en forma de impulso nervioso a través de los axones de las células de Purkinje hacia los núcleos profundos. En los núcleos profundos se integra la señal inhibitoria recibida por las células de Purkinje y las señales excitatorias recibidas por las fibras aferentes (fibras musgosas y trepadoras).

Una vez integrada la información se genera una respuesta que es enviada por las fibras eferentes de los núcleos profundos hacia el tálamo, corteza, médula espinal y los núcleos motores del tronco del encéfalo.



1.2.3. Mecanismos moleculares patogénicos en las ataxias espinocerebelosas

No se conoce bien el proceso por el que la mutación origina la muerte de las neuronas en las enfermedades poliglutaminicas, aunque existe cierto consenso en cuanto a que deben ser varios los mecanismos celulares y moleculares implicados. Se ha postulado que los procesos que llevan a la degeneración de las neuronas dependen tanto de la función de la proteína normal como de la vulnerabilidad celular a la mutación (Carlson et al., 2009). Sin embargo, varios estudios han demostrado la presencia de una serie de mecanismos comunes a todas estas enfermedades. Estos mecanismos actuarían cooperativamente generando en la célula una disfunción sináptica, que conduciría a la degeneración y posterior muerte de tipos neuronales específicos (Carlson et al., 2009; Matilla-Dueñas et al., 2010, 2014). En la Figura 2 se muestra un esquema de los principales mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de las SCAs.

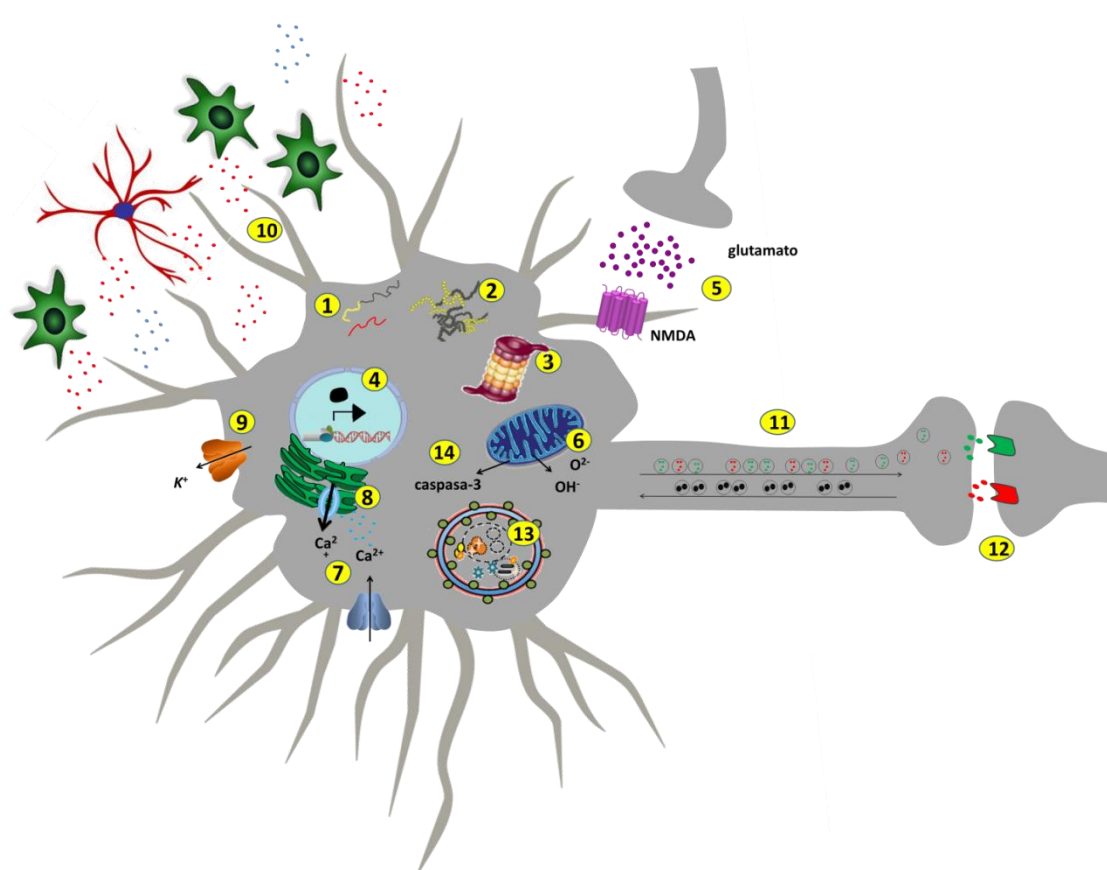


Figura 2. Principales mecanismos moleculares de neurodegeneración en las SCAs. 1, alteraciones interacciones proteína-proteína; 2, agregación; 3, disfunción del proteasoma; 4, desregulación transcripcional; 5, excitotoxicidad; 6, disfunción mitocondrial (estrés oxidativo); 7, disfunción señalización por calcio; 8, estrés del retículo; 9, alteraciones canales iónicos; 10, activación glial; 11, transporte axonal; 12, alteraciones en la transmisión sináptica; 13, autofagia; 14, apoptosis. Imagen adaptada de Matilla-Dueñas et al. (2010).

Entre los mecanismos de neurodegeneración en las SCAs se incluyen:

- Cambios en la conformación de la proteína

La expansión de poliQ impide el plegamiento normal de la proteína lo que va asociado a alteraciones en las interacciones proteína-proteína que pueden conducir a una desregulación en su función. En estas condiciones la mutación puede producir tanto una pérdida de la función normal de la proteína como una ganancia de dicha función que resulta ser tóxica para la célula. Por otro lado, el plegamiento anormal de la proteína mutada también produce fallos en la degradación proteica a través del sistema ubiquitina proteasoma, las proteínas mutadas libres en el citoplasma son entonces susceptibles de ser degradadas parcialmente por varias proteasas dando lugar a la generación de fragmentos tóxicos (Gatchel y Zoghbi, 2005; Matilla-Dueñas et al., 2014; Perez et al., 1999).

- Alteraciones en los procesos de transcripción

Las proteínas con expansiones de poliQ, así como los fragmentos procedentes de la degradación parcial de estas proteínas, pueden agregarse dando lugar a la formación de inclusiones nucleares y citoplasmáticas características, que contienen componentes celulares como ubiquitina, componentes del proteosoma, la chaperona HSP70 y factores de transcripción, entre otros (Matilla-Dueñas et al., 2010; McCampbell et al., 2000). Los agregados aparecen en los tejidos que son más susceptibles a la degeneración, a pesar de la expresión ubicua de las proteínas expandidas (Paulson et al., 1997). Como consecuencia del secuestro de determinadas proteínas implicadas en la regulación génica, en concreto factores de transcripción, activadores, coactivadores, etc, se pueden producir alteraciones en la transcripción de diferentes genes implicados en la supervivencia celular, como es el caso del gen para el factor neurotrófica derivado de cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) (Takahashi et al., 2012) o de p53 (Chou et al., 2011). Estas alteraciones en los procesos de transcripción parecen ser un mecanismo predominante en la patogénesis de las enfermedades poliglutamínicas (Riley y Orr, 2006).

- Excitotoxicidad

Los procesos de excitotoxicidad parecen ser un mecanismo patogénico común en las SCAs causadas por la repetición de tripletes CAG, donde diferentes elementos implicados en la transmisión glutamatérgica, en la señalización mediada por calcio y en vías de señalización celular de supervivencia (como la de las MAP quinasas) se ven alterados a nivel transcripcional (Chou et al., 2008; Custer et al., 2006; Liu et al., 2009; Serra et al., 2004).

- Alteraciones en la señalización por calcio

Se ha propuesto que las mutaciones en los genes de SCA causan interrupciones en las vías de señalización mediadas por calcio y que estas alteraciones son un evento fundamental en los procesos que llevan a la disfunción cerebelosa característica (Kasumu y Bezprozvanny, 2012).

Entre estas alteraciones destacan por un lado mutaciones en genes implicados en la homeostasis del calcio, como el canal de calcio en la SCA6, por otro lado la presencia de proteínas mutadas o fragmentos proteicos conteniendo poliQ producen daño mitocondrial que en último término afectan también en la homeostasis del calcio.

- Procesos de estrés oxidativo

Varios estudios han evidenciado el papel del estrés oxidativo en la patogenia de las SCAs. En el caso de la SCA3 se ha demostrado cómo la presencia de ataxina-3 mutada reduce la respuesta antioxidante y produce disfunción mitocondrial en varios modelos celulares de la enfermedad (Araujo et al., 2011; Chou et al., 2006; Yu et al., 2009, 2009; Zhou et al., 2013).

- Activación glial

Aunque el papel de las células gliales en las SCAs no está definido del todo, la activación de células de microglía en los núcleos del tronco cerebral de pacientes de SCA ofrece indicios de que estas células podrían contribuir a los procesos patogénicos de la enfermedad. Algunos trabajos han demostrado también una activación de astrocitos en las áreas afectadas. Sin embargo, los datos muestran que estas células pueden estar ausentes en otras zonas donde existe una degeneración avanzada (revisado en Rüb et al., 2013).

- Alteraciones en la neurotransmisión

En las SCAs los síntomas motores aparecen antes de que se produzca la muerte neuronal. Esto sugiere que uno de los primeros efectos de la proteína mutada es alterar funciones básicas de las neuronas implicadas en los circuitos cerebelosos, entre las que se incluyen alteraciones en la plasticidad sináptica (Carlson et al., 2009; Matilla-Dueñas et al., 2010). Estudios realizados con modelos animales de SCA demuestran la importancia de una correcta transmisión sináptica en las células de Purkinje para la función motora. Así, se ha demostrado que ratones carentes del receptor de glutamato mGluR1 en las células de Purkinje presentan deficiencias motoras significativas, unas deficiencias que son restauradas mediante la expresión del receptor de glutamato en dichas células (Ichise et al., 2000). En este sentido, se han descrito alteraciones en la tasa de disparo de las células de Purkinje, en las fases pre-sintomáticas de la SCA1 y la SCA3, asociadas a una reducción en la eficiencia de las sinapsis glutamatérgicas en estas células (Hourez et al., 2011; Konno et al., 2014).

- Autofagia

Las proteínas mal plegadas en las SCAs se degradan principalmente por el sistema de ubiquitina-proteasoma, pero también pueden hacerlo a través del sistema lisosomal/autofágico (Iwata et al., 2005). La autofagia es un proceso celular que se encarga de la degradación y reciclaje de componentes celulares. En condiciones normales la autofagia tiene un papel esencial en la obtención de nutrientes en condiciones de ayuno y en la degradación de proteínas mutadas u orgánulos dañados, permitiendo a las células sobrevivir en condiciones de

estrés. En las enfermedades neurodegenerativas, la autofagia se ha propuesto podría desempeñar un papel fundamental en el aclaramiento de las proteínas y agregados tóxicos en las neuronas sugiriendo una posible estrategia terapéutica en estas enfermedades mediante la modulación de este proceso autofágico, que estaría dirigida a inducir este proceso para promover la eliminación de las proteínas mutadas y agregadas en estas enfermedades. Sin embargo, es importante destacar aunque la autofagia es en principio un proceso protector de la célula puede también jugar un papel en la muerte celular.

1.2.4. Terapéutica en las ataxias espinocerebelosas

Como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, la eficacia de los tratamientos farmacológicos ensayados en las SCAs es aún muy limitada. Si bien no existe una terapia protectora y curativa, hay varias opciones terapéuticas sintomáticas dirigidas a mejorar la calidad de vida de los pacientes. Por ejemplo, los síntomas parkinsonianos característicos de algunas de las SCAs (temblor, bradiquinesia o distonía) pueden responder al tratamiento con levodopa o agonistas dopaminérgicos. La espasticidad en las SCAs se puede tratar con baclofeno, tizanadina, o mimentina y los temblores con benzodiazepinas o bloqueantes β -adrenérgicos. Los calambres musculares, a menudo presentes al inicio de las SCAs 2, 3, 7, y de la DRPLA se alivian con magnesio, quinina, o mexiletina. Por último, un ensayo con gabapentina (que estimula la neurotransmisión GABAérgica) ha mostrado mejora de los síntomas cerebelosos en pacientes con ataxia (Matilla-Dueñas et al., 2010).

Respecto a tratamientos neuroprotectores, que prácticamente no existen en las SCAs, se cree ahora que se conocen mejor los procesos moleculares implicados en la progresión de la enfermedad, que quizás sea necesario tratar simultáneamente distintas dianas moleculares para prevenir la neurodegeneración y conservar la función neuronal y se han diseñado algunas estrategias al respecto (Matilla-Dueñas et al., 2010).

1.2.5. Ataxia espinocerebelosa de tipo 3

La SCA3, conocida como Enfermedad de Machado Joseph, fue descrita por primera vez en la década de los años 70 en dos familias portuguesas (Nakano et al., 1972; Rosenberg et al., 1976). Esta enfermedad se considera actualmente la forma más común y prevalente de SCA en todo el mundo (Schöls et al., 2004). Sin embargo, incluso dentro de cada país, el patrón de distribución geográfica no es homogéneo. Así, aunque constituye el subtipo más frecuente de SCA en Portugal (3 casos por cada 100.000 individuos) la enfermedad es relativamente rara en la parte continental (1/100.000), pero muy frecuente en las Islas Azores. Concretamente en la isla de Flores es donde se produce la mayor prevalencia en todo el mundo (1/239) (Bettencourt y Lima, 2011).

En la SCA3 el gen responsable de la enfermedad fue descubierto en 1994 y se encuentra localizado en el locus 14q32.12. Este gen codifica para la proteína ataxina-3, cuyo peso molecular es de 42KDa (Kawaguchi et al., 1994). La base genética de la enfermedad consiste en la expansión del trinucleótido CAG en la región codificante del exón 10. La presencia de esta expansión da lugar a la formación de una cola anormal de poliglutaminas, en el extremo amino-terminal de la ataxina-3. En individuos sanos, el número de repeticiones del triplete CAG es entre 12 y 40,

mientras que en la mayoría de los pacientes en los que aparece la enfermedad aparecen más de 55 repeticiones (Durr et al., 1996). La ataxina-3 se expresa de forma ubicua en todas las células del organismo. En condiciones normales la proteína se localiza en el citoplasma celular. La presencia de la expansión de glutaminas produce la formación de agregados que se depositan en forma de inclusiones nucleares a través de los mecanismos descritos anteriormente. La ataxina-3 mutante se acumula en células nerviosas de muchas regiones cerebrales, incluso en regiones que no están afectadas en la enfermedad. Esto ha sugerido que quizás las inclusiones nucleares no producen la muerte neuronal *per se*, pero su presencia hace pensar que la agregación y acumulación de proteínas probablemente juega un papel clave en el proceso neurodegenerativo de la SCA3 (Rüb et al., 2013).

Macroscópicamente los cerebros de los enfermos de SCA3 muestran un volumen significativamente menor que el de los individuos sanos. En la mayoría de los casos se observa una atrofia del cerebelo, protuberancia y médula espinal (Koeppen, 2005; Riess et al., 2008; Taroni y DiDonato, 2004). Mediante resonancia magnética se ha podido comprobar que la progresiva atrofia del cerebelo y del tronco encefálico en los pacientes de SCA3 se correlaciona tanto con el número de repeticiones CAG como con la edad de los pacientes (Onodera et al., 1998). El núcleo caudado y el putamen también ven reducido su volumen en la SCA3, a diferencia de lo que ocurre en otras SCAs como la SCA1 o la SCA2 (Klockgether et al., 1998). Algunos autores también han descrito una atrofia del globo pálido en esta enfermedad (Murata et al., 1998). Mediante estudios funcionales de tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *Positron Emission Tomography*) con fluorodeoxiglucosa se ha demostrado hipometabolismo en el cerebelo, tronco encefálico, y corteza cerebral (Soong et al., 1997; Taniwaki et al., 1997). Los estudios PET llevados a cabo en pacientes asintomáticos parecen indicar que las primeras alteraciones metabólicas se dan en el cerebelo y tronco cerebral, antes, incluso, de que se observe atrofia en estas estructuras (Soong y Liu, 1998).

A nivel microscópico en la SCA3, la lesión histológica principal es la atrofia severa de las neuronas del núcleo dentado y de sus fibras aferentes. En particular, se observa una dramática disminución del número de neuronas del núcleo dentado y las neuronas atroficas restantes exhiben degeneración grumosa, un tipo de degeneración neuronal asociada a la proliferación de terminales sinápticos patológicos en torno al cuerpo neuronal (Koeppen, 2005; Koeppen et al., 2013). Sin embargo, en contraste con lo que se observa en otros tipos de ataxia de herencia dominante, en la SCA3 la corteza cerebelosa y la oliva inferior mantienen una estructura conservada. El estudio neuropatológico revela también la pérdida variable de neuronas en la protuberancia, sustancia negra, así como en varios núcleos motores de los nervios craneales. En la médula espinal también se observa pérdida neuronal severa en el núcleo dorsal y en las neuronas motoras del asta anterior (Koeppen, 2005; Riess et al., 2008; Taroni y DiDonato, 2004). Los pacientes con SCA3 a menudo presentan una pérdida variable de mielina en los nervios periféricos relacionados con la transmisión de los impulsos motores (Lin y Soong, 2002).

Estudios realizados sobre líneas celulares y tejidos *post mortem* de cerebro de pacientes con este tipo de SCA, han confirmado la participación de los procesos inflamatorios en la patogénesis de la enfermedad. Así, se han observado cambios tempranos en la expresión de varios genes y proteínas involucrados en la respuesta inmune, como el factor de transcripción C/EBP o la interleuquina proinflamatoria IL-1 β (Evert et al., 2001, 2006). Se han descrito también procesos de astrogliosis en varias regiones cerebrales, tanto en aquellas afectadas en la

enfermedad como en zonas sin degeneración aparente. Es importante resaltar que, además, se ha observado que estos procesos pueden estar ausentes en regiones con una elevada degeneración (Evert et al., 2001; Rüb et al., 2013). Estos datos sugieren que esta activación puede no ser un mecanismo esencial en el desarrollo de la enfermedad sino una respuesta endógena para mantener la funcionalidad e integridad celular. En cuanto a la microglía se ha observado una activación de estas células en los núcleos afectados en la enfermedad (Evert et al., 2001; Rüb et al., 2013).

2. CANNABINOIDES

El término “cannabinoide” ha sido utilizado de forma tradicional para definir un grupo de moléculas químicas presentes en la naturaleza de forma exclusiva en la planta *Cannabis sativa* (

Cuadro 2). Sin embargo, el descubrimiento del sistema de señalización intercelular a través del cual actúan estos compuestos, el sistema cannabinoide endógeno (SCE), ha hecho que este término englobe hoy también a todas aquellas sustancias químicas, independientemente de su origen o estructura, que comparten mecanismos de acción comunes produciendo en el organismo efectos similares a los causados por los derivados del *cannabis*.

Los cannabinoides se pueden clasificar en tres categorías: (i) los fitocannabinoides, que son los cannabinoides producidos por la planta *Cannabis sativa*; (ii) los endocannabinoides, que son moléculas endógenas de origen animal y (iii) los cannabinoides sintéticos, que corresponden a aquellos compuestos generados en el laboratorio mediante síntesis química.

Los fitocannabinoides son sustancias procedentes del metabolismo secundario de la planta *Cannabis sativa* que se presentan, de forma exclusiva, en algunas variedades de la misma (Dewey, 1986). Desde un punto de vista químico, los cannabinoides pertenecen a la familia química de los terpenoides, un conjunto de moléculas orgánicas que ejercen un amplio espectro de funciones en las plantas, principalmente como pigmentos pero también contribuyen a dar olor y sabor a las mismas. Muchos terpenoides, además, presentan propiedades medicinales por su carácter antimicrobiano y/o antiinflamatorio (Hanson, 2007; Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 2012; Wang et al., 2005). En la actualidad se han identificado cerca de 70 fitocannabinoides distintos. El mejor conocido, por su abundancia en la planta y por su fuerte actividad biológica, es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni y Mechoulam, 1964). Otros fitocannabinoides son el cannabinal (CBN), el cannabidiol (CBD), el cannabicromeno (CBC) o el cannabigerol (CBG) (Turner et al., 1980) (Figura 3).

Todos estos compuestos varían en número y cantidad en la planta, en dependencia del clima, tipo de suelo y variedad cultivada. Esta variación también depende de la parte de la planta utilizada para su extracción, encontrándose los niveles más altos de cannabinoides en las inflorescencias de la planta femenina, en la resina viscosa que se produce en los tricomas. Se han propuesto varias teorías para explicar el papel biológico de los cannabinoides en la planta, siendo la mejor apoyada su actividad antibiótica y su contribución a la tolerancia a la sequía y a las altas temperaturas (Krejci, 1970; Schultes, 1970).

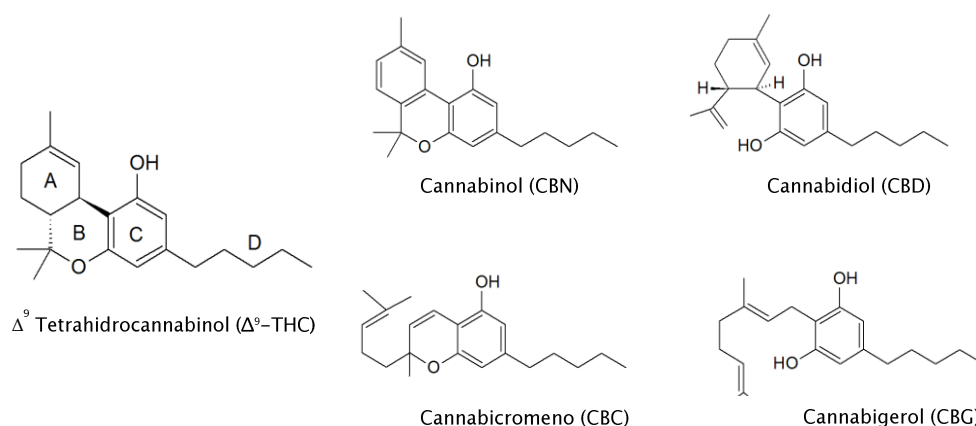


Figura 3. Estructura química de los fitocannabinoides más representativos. La mayoría de los cannabinoides de la planta *Cannabis sativa* están formados por un esqueleto tricíclico de 21 carbonos. En particular los cannabinoides se caracterizan por poseer en su estructura: (i) un anillo, generalmente no aromático, de seis carbonos (anillo A) (la potencia del cannabinoide se reduce saturando el anillo); (ii) un anillo de pirano (anillo B) que no parece esencial en la actividad farmacológica de estos compuestos y (iii) un benceno (anillo C) con la posición 1 sustituida (generalmente con un hidroxilo) y con un grupo alquilo en posición 3 (D). Los cannabinoides más abundantes en la planta del cannabis tienen en esta posición una cadena pentilo, pero también se han descrito grupos propilo y metilo. La potencia del Δ⁹-THC y otros cannabinoides parece depender de esta cadena alifática (Martin et al., 1991; Mechoulam R et al., 1992).

A pesar de que los efectos del consumo del *cannabis* en el organismo se conocen desde la antigüedad (Mechoulam y Hanus 2000), no fue hasta 1964 cuando se consiguió aislar el principio psicoactivo de la *Cannabis sativa*, el Δ⁹-THC (Gaoni y Mechoulam, 1964). Este descubrimiento permitió el diseño en el laboratorio de análogos estructurales que han sido de gran utilidad para el estudio farmacológico de estos compuestos. Un ejemplo de ello es el desarrollo del ligando sintético CP-55,940 que permitió demostrar a finales de los años 80 la capacidad de unión de los cannabinoides a receptores celulares específicos en membranas de cerebro de rata (Devane et al., 1988), los llamados receptores cannabinoides. En 1990, Matsuda y colaboradores clonaron el primer receptor cannabinoide, que hoy se conoce como receptor cannabinoide CB₁ (Matsuda et al., 1990), tres años más tarde, se clonó el segundo subtipo de receptor cannabinoide, el receptor cannabinoide CB₂ (Munro et al., 1993). Poco tiempo después del descubrimiento del primer receptor cannabinoide se identificaron sus ligandos endógenos, los endocannabinoides *N*-araquidonoiletanolamina o anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1996).

Cuadro 2: CANNABIS SATIVA

Cannabis sativa L. (Linnaeus C, 1753), llamado comúnmente *cannabis* o cáñamo, es una herbácea anual del orden de los Urticales que pertenece a la familia de las Cannabáceas (Schultes, 1970).

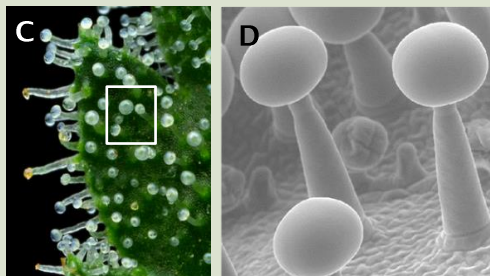


De hojas palmeadas (Figura A) y tallo erguido el *cannabis* es un arbusto verde que crece silvestre en zonas de clima templado. Se trata de una planta dioica, con flores unisexuales desarrolladas sobre individuos diferentes, lo que significa que existen ejemplares machos y hembras. En comparación con el macho, la hembra es generalmente más frondosa, menos alta, florece más tarde y su ciclo vital se extiende hasta la madurez de las semillas, las cuales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 y omega-6 (Montserrat-de la Paz et al., 2014).

Las plantas masculinas presentan flores dispuestas en forma de panículas terminales mientras que en las femeninas las flores son más compactas y aparecen reunidas en glomérulos (Figura B) con una polinización muy rica en **aceites esenciales y resinosos**.



Esta resina, responsable de la actividad farmacológica del *cannabis*, se secreta en los tricomas (Figura C, D) de las glándulas epidérmicas y está presente en diferentes proporciones, pudiendo ser hasta un 20% del peso de la planta (Fujita et al., 1967; Small et al.).



Hasta la actualidad se han aislado e identificado cerca de 500 compuestos naturales provenientes del metabolismo de esta planta entre los que destacan diversos alcaloides, flavonoides, monosacáridos, ácidos grasos, terpenos, fenoles, compuestos nitrogenados y los principales principios activos de la planta, los **cannabinoides** (Elsohly y Slade, 2005; Turner et al., 1980).

La *Cannabis sativa* y más concretamente sus formas de preparación, marihuana y hachís, son en la actualidad una de las drogas de abuso más consumidas en las sociedades occidentales por los efectos psicoactivos de los cannabinoides. Pero esta planta, posiblemente una de las más antiguas cultivadas por el hombre, tiene tras de sí una historia milenaria como planta medicinal.

Las primeras evidencias de su **utilidad terapéutica** se remontan al año 2737 a.C. en China, donde se recoge en manuscritos de farmacopea su utilidad para el tratamiento de diversas dolencias. Pero en Europa, no es hasta el siglo XIX cuando el cannabis se convierte en una medicina común y de uso legal por su utilidad en el tratamiento del dolor, convulsiones, espasmos y emesis (Mechoulam y Hanus 2000). Esto duró hasta 1937, cuando fue retirada de la práctica médica y considerada una sustancia ilegal debido a sus efectos sobre el sistema nervioso central (Evans, 1997).

3. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

Los endocannabinoides, junto con los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y la maquinaria bioquímica implicada en su síntesis y degradación, conforman el llamado sistema cannabinoide endógeno, un importante sistema de modulación de múltiples respuestas fisiológicas tanto a nivel central como periférico.

El conocimiento de la complejidad del sistema cannabinoide endógeno y su relevancia fisiológica ha ido creciendo en los últimos años, lo que ha permitido descubrir su importante papel en el mantenimiento de la homeostasis celular ya que se han observado alteraciones de este sistema en multitud de condiciones patológicas. Por este motivo, la manipulación farmacológica de este sistema de señalización celular se plantea como una herramienta terapéutica muy prometedora en el tratamiento de diversas patologías.

3.1. Receptores cannabinoides

Los cannabinoides ejercen su acción farmacológica mediante la activación de receptores específicos de membrana. Hasta el momento se han identificado y clonado dos receptores para cannabinoides, denominados CB₁ (Matsuda et al., 1990) y CB₂ (Munro et al., 1993), ambos receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete fragmentos transmembranales en su estructura (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*) (Mackie, 2005) (Figura 4).

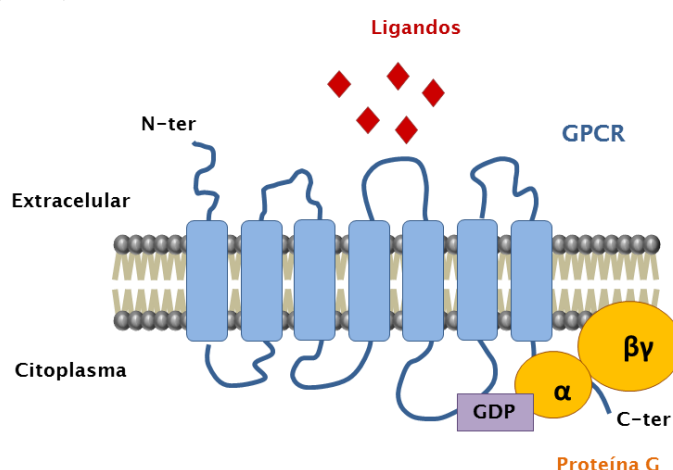


Figura 4. Receptores acoplados a proteína G. Los GPCRs son proteínas integrales de membrana, que se caracterizan por poseer un dominio amino-terminal extracelular, 7 hélices α -transmembrana conectadas por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares, terminando en un dominio intracelular carboxilo-terminal. Los GPCR deben su nombre a la interacción con las proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas G heterotriméricas tienen actividad GTPasa, es decir, unen e hidrolizan trifosfato de guanosina (GTP) generando difosfato de guanosina (GDP). Están constituidas por tres subunidades, denominadas α , β y γ , siendo la subunidad α la responsable de la unión e hidrólisis de GTP. Existen cuatro familias para la subunidad α en mamíferos, que se caracterizan por su estructura primaria y por la cascada de señalización que activan: (i) La familia $G_{\alpha s}$ estimula la adenil ciclasa (AC); (ii) la $G_{\alpha i/o}$ inhibe la AC; (iii) la $G_{\alpha q/11}$ activa la fosfolipasa C β (PLC β) y (iv) la $G_{\alpha 12/13}$ regula las proteínas de la familia Rho (Milligan y Kostenis, 2006).

Así mismo, existen evidencias de que existen otros sitios de unión de cannabinoides que podrían explicar algunos de los efectos fisiológicos no mediados por los receptores CB₁/CB₂ (Di Marzo et al., 2000), concretamente, se ha visto que algunos cannabinoides pueden unirse a otros receptores huérfanos acoplados a proteínas G, como el GPR55. Además ciertos cannabinoides también pueden unirse a receptores de potencial transitorio (TRPs, del inglés *transient receptor potential*) como el receptor de vanilloides de tipo 1 (TRPV1) (De Petrocellis et al., 2011). Por último, se ha demostrado que algunos cannabinoides tienen la capacidad de activar de forma directa o indirecta los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, del inglés *peroxisome proliferator activated receptor*) (Sun y Bennett, 2007).

3.1.1. Receptor CB₁

El receptor CB₁ es un polipéptido de 476 aminoácidos y está implicado, entre otros, en los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (Ledent et al., 1999). La ubicación genética del locus para este GPCR en humanos está en el cromosoma 6, concretamente en la posición 6q14-6q15 (Hoehe et al., 1991) y presenta una secuencia altamente conservada entre las distintas especies de vertebrados estudiadas (Valenti et al., 2005).

El receptor CB₁ está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y es considerado el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro de mamíferos (Herkenham et al., 1991a). Estudios neuroanatómicos han revelado que su expresión es muy elevada en hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, ganglios basales, y de forma más moderada aparece en áreas límbicas como el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y la amígdala (Herkenham et al., 1991a). Además del sistema nervioso central (SNC), los receptores CB₁ también están presentes en tejidos periféricos. Se ha descrito en bazo, pulmón, endotelio vascular, músculo liso, hígado y páncreas, entre otros, donde ejercen también un relevante papel modulador (Bermúdez-Silva et al., 2008; Galiègue et al., 1995; Ishac et al., 1996; Pertwee, 2001).

La localización subcelular de los receptores CB₁ es diversa. Por un lado, los receptores CB₁ se localizan en la membrana plasmática desde donde participan en la comunicación celular paracrina. En el sistema nervioso, el receptor CB₁ se expresa de forma abundante en los terminales presinápticos de las neuronas, ejerciendo un papel muy importante en la modulación de la liberación de neurotransmisores. Con esta localización el receptor CB₁ se ha descrito en varios fenotipos neuronales (neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas, glicinérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas) dentro de regiones cerebrales particulares (Szabo y Schlicker, 2005). Aunque la acción principal de los receptores CB₁ tiene lugar a nivel presináptico, también se han encontrado receptores CB₁ a nivel postsináptico, donde podrían actuar controlando la excitabilidad de las dendritas, y también a nivel extrasináptico, lo que podría tener que ver con mecanismos de reciclaje o procesos de nueva síntesis de los receptores CB₁ (Köfalvi et al., 2005). De forma más reciente, se ha observado la presencia del receptor CB₁ en la membrana mitocondrial externa de neuronas, sugiriendo que el receptor CB₁ podría tener capacidad para modular la respiración mitocondrial y, por lo tanto, la disponibilidad de energía en las neuronas, y para regular la homeostasis del calcio (Bénard et al., 2012).

Además de su presencia en neuronas, el receptor CB₁ se localiza en otras células nerviosas como los astrocitos (Sánchez et al., 1998) donde juega un papel crucial en la comunicación entre

neuronas y astrocitos (Navarrete y Araque, 2008, 2010; Navarrete et al., 2014). También se ha observado expresión de CB1 en otras células gliales como oligodendrocitos y microglía (Cabral et al., 2001; Molina-Holgado et al., 2002), además de participar en la diferenciación y especificación de las células madre neurales en distintos tipos celulares en células precursoras neurales (Compagnucci et al., 2013) y de oligodendrocitos (Aguado et al., 2005, 2006, 2007; Compagnucci et al., 2013).

3.1.2. Receptor CB₂

El receptor CB₂ es un polipéptido de 360 aminoácidos y está implicado fundamentalmente en los efectos inmunomoduladores atribuidos a los cannabinoides. El receptor CB₂ también es un receptor de la familia GPCR que tiene su representación génica a nivel del cromosoma 1 (en humanos), en el área 1p35-1p36. Presenta una homología del 44% (68% en las regiones transmembrana) con el receptor CB₁. También presenta mucha más divergencia en cuanto a su homología entre especies, siendo ésta solo del 81% entre la rata y el humano (Begg et al., 2005; Matsuda, 1997).

Durante años se creía que el receptor CB₂ se localizaba exclusivamente en tejidos periféricos principalmente en células del sistema inmunitario, especialmente en el bazo, en las amígdalas y en diferentes células del sistema linfóide (linfocitos B y T y monocitos) (Galiègue et al., 1995). Sin embargo, varios estudios han descrito la presencia de este receptor en tejidos periféricos que no pertenecen al sistema inmune, tales como corazón, células endoteliales, células óseas, células hepáticas y en las células secretoras de somatostatina del páncreas (Bouchard et al., 2003; Joyeux et al., 2002; Zoratti et al., 2003). También se ha demostrado la presencia de receptores CB₂ en el SNC, principalmente en astrocitos y en células microgliales, sobre todo en relación con procesos de activación de estas células en las que cambian su fenotipo como consecuencia de daño cerebral de origen inflamatorio, infeccioso, traumático o tóxico (Benito et al., 2008). De forma más reciente se ha identificado el receptor CB₂ en algunas subpoblaciones neuronales preferentemente en el tronco cerebral, en el cerebelo y en el mesencéfalo (García et al., 2015; Lanciego et al., 2011; Van Sickle et al., 2005; Skaper et al., 1996).

No obstante, la distribución en los tejidos del receptor CB₂ ha sido siempre una fuente de controversia debido a que no existen de momento buenas herramientas metodológicas (por ejemplo anticuerpos selectivos) que faciliten su identificación celular (Atwood y Mackie, 2010).

3.1.3. Otros receptores celulares con actividad cannabinoide

Existen evidencias de que puedan existir otros receptores celulares con actividad cannabinoide, como por ejemplo varios receptores huérfanos acoplados a proteínas G: GPR18, GPR119 y GPR55. Estos receptores se expresan de forma abundante en el sistema nervioso y son activados por la acción de lípidos señalizadores derivados de ácidos grasos, entre ellos ciertos endocannabinoides y moléculas relacionadas (Kohno et al., 2006; McHugh, 2012; Syed et al., 2012; Sylantyev et al., 2013). En este sentido, se ha propuesto que el receptor huérfano GPR55 sea considerado un nuevo receptor cannabinoide “de tipo 3” (CB₃), aunque no todos los investigadores están de acuerdo con esta idea (Ross, 2009; Sharir y Abood, 2010). El receptor GPR55 muestra una

baja homología con las secuencias de los receptores CB₁ (13%) y CB₂ (14%) y presenta una farmacología distinta a la de estos receptores (Moriconi et al., 2010; Ryberg et al., 2007). De forma reciente se ha postulado la implicación de este receptor en la comunicación sináptica (Sylantsev et al., 2013).

Los cannabinoides pueden unirse también a algunos TRPs, una extensa familia de canales iónicos con un papel fundamental en la transducción de los estímulos somatosensoriales (De Petrocellis et al., 2011). Algunos autores consideran que los canales TRP podrían ser los receptores ionotrópicos del sistema cannabinoide endógeno (Di Marzo et al., 2002). Los TRPs activados por cannabinoides pertenecen a dos grupos: el grupo de los receptores vanilloides (TRPVs, del inglés *transient receptor potential vanilloid receptor*) y los receptores de anquirina (TRPAs), involucrados ambos en la integración de estímulos térmicos y dolorosos, especialmente de tipo inflamatorio y neuropático (Caterina y Julius, 2001; Dhaka et al., 2006; Jiang et al., 2011; Macpherson et al., 2007). Los cannabinoides de la planta *Cannabis sativa* actúan como estímulos externos, activando específicamente y de forma variable, en función de su estructura química, los receptores de potencial transitorio TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPA1 (Jordt et al., 2004; De Petrocellis et al., 2008, 2012; Qin et al., 2008). En cuanto a los ligandos endógenos, se ha descrito que la AEA tiene capacidad para activar los receptores vanilloides TRPV1 y TRPV4 (Watanabe et al., 2003; Zygmunt et al., 1999).

El último gran grupo de receptores sobre los que pueden actuar los cannabinoides son los PPARs (Sun y Bennett, 2007). Los receptores PPARs son una familia de receptores nucleares pertenecientes a la superfamilia de receptores esteroideos, que incluye tres isoformas: PPAR- α , PPAR- β/δ y PPAR- γ . Los PPARs heterodimerizan con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR, del inglés *retinoid X receptor*) y se unen a elementos de respuesta induciendo la transcripción de genes diana involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación (Ferré, 2004; Moraes et al., 2006; Stienstra et al., 2007). En el cerebro los PPARs se expresan tanto en neuronas como en células gliales (oligodendrocitos, astrocitos y microglía) (Cristiano et al., 2001; Cullingford et al., 1998; Moreno et al., 2004). Ciertos cannabinoides, como por ejemplo el Δ^9 -THC, activan los receptores PPAR- α y PPAR- γ (Citraro et al., 2013; Mestre et al., 2009; O'Sullivan y Kendall, 2010; Sun et al., 2006).

3.2. Endocannabinoides

Los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides son compuestos de naturaleza lipídica derivados del metabolismo de fosfolípidos de membrana. En particular, los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico, que es también precursor de la biosíntesis de las prostaglandinas y mediador en los procesos inflamatorios. Los más representativos son la araquidonoiletanolamida, también llamada anandamida (Devane et al., 1992) y el 2-araquidonoil glicerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995) y son en los que nos centraremos en los siguientes apartados de la Introducción. Otros cannabinoides endógenos que han sido identificados posteriormente son el 2-araquidonilgliceril éter, también llamado noladin éter o noladina (Hanus et al., 2001), la O-araquidonoiletanolamina (virodamina) (Porter et al., 2002), la N-araquidonildopamina (NADA) (Bisogno et al., 2000) y más recientemente la N-

araquidonil-L-serina (ARA-S) (Guo et al., 2008; Milman et al., 2006; Zhang et al., 2010) (Figura 5). Aunque algunos de estos compuesto (por ejemplo NADA) se les considera como endovanilloides más que como endocannabinoides (Starowicz et al., 2007).

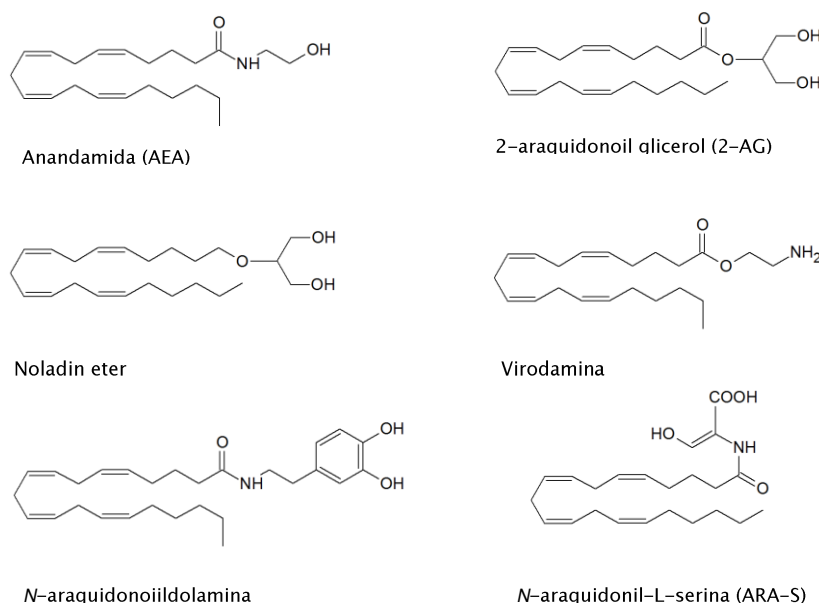


Figura 5. Estructura química de los principales endocannabinoides/endovanilloides. Todos los compuestos endocannabinoides descritos hasta la fecha pertenecen a la familia química de los eicosanoides. Unas moléculas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que presentan una cabeza polar en su estructura. Esta cabeza polar puede estar unida al ácido graso a través de un enlace tipo amida (AEA, NADA y ARA-S), éster (2-AG y virodamina), o éter (noladina) (Di Marzo et al., 2004).

3.2.1. Anandamida

La AEA es un derivado del ácido araquidónico y la etanolamina. Los niveles de AEA son, en general, bastante bajos en el cerebro. En general puede afirmarse que existe una muy buena correlación entre los lugares donde se expresan los receptores CB_1 y los lugares en los que se observa presencia de AEA. Así los niveles más altos de este endocannabinoide, se encuentran en áreas que presentan una elevada densidad del receptor CB_1 como el hipocampo, corteza cerebral y estriado (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996). Sin embargo, esta correlación no es completa ya que en otras áreas como el tálamo o el tronco cerebral, que poseen pocos receptores cannabinoides, se observan altos niveles del endocannabinoide y en cambio, en el cerebelo, donde se encuentra el receptor CB_1 de forma abundante, los niveles de AEA son bajos (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996; Yang et al., 1999). A nivel periférico, la AEA se localiza sobre todo en el bazo, el corazón y en la piel (Felder et al., 1996).

Este endocannabinoide es capaz de unirse a los dos receptores cannabinoides clásicos, CB_1 y CB_2 (Felder et al., 1995). Con respecto al receptor CB_1 , la AEA se comporta como un agonista puro o parcial, dependiendo del tejido y de la respuesta biológica estudiada (Pacher et al., 2006). En cuanto al receptor CB_2 , la AEA es agonista de este receptor, pero se une a él con menor afinidad que al receptor CB_1 (Felder y Glass, 1998; Pertwee, 1999). La AEA no sólo activa a los receptores cannabinoides clásicos, sino que también se une al receptor vanilloide TRPV1 (Zygmunt et al., 1999) y puede que al GPR55, aunque los resultados obtenidos para este receptor son aún contradictorios (Kapur et al., 2009; Lauckner et al., 2008; Ryberg et al., 2007; Waldeck-Weiermair et

al., 2008). Por otro lado, la AEA presenta también la capacidad de activar los receptores nucleares PPAR- α (Sun et al., 2006) y los PPAR- γ (O'Sullivan y Kendall, 2010).

En cuanto a la acción farmacológica de la AEA se sabe que cuando se administra a dosis altas mimetiza determinados efectos comportamentales que se observan tras la administración de los cannabinoides sintéticos y vegetales como la catalepsia, la disminución de la actividad motora, la antinocicepción y la hipotermia (Crawley et al., 1993; Fride y Mechoulam, 1993; Smith et al., 1994).

3.2.2. 2-Araquidonoil glicerol

El 2-AG es el cannabinoide endógeno más abundante en el cerebro y su concentración es aproximadamente tres órdenes de magnitud superior a la de la AEA (Blankman y Cravatt, 2013). El 2-AG es un éster formado entre el ácido araquidónico y glicerol. Este cannabinoide se ha identificado en varias regiones del SNC presentando las máximas concentraciones en el tronco cerebral, estriado e hipocampo y las más bajas en corteza cerebral, diencéfalo y cerebelo (Bisogno et al., 1999). También se le ha encontrado en órganos periféricos donde predomina en el intestino, bazo y páncreas (Mechoulam et al., 1995) y posteriormente se le ha identificado en otros órganos como el corazón, hígado y riñón (Kondo et al., 1998). El 2-AG tiene una afinidad por los receptores CB₁ y CB₂ similar a la de la AEA (Gonsiorek et al., 2000; Pertwee y Ross, 2002).

La administración intravenosa de 2-AG en ratones provoca los mismos efectos que el Δ^9 -THC: analgesia, disminución de la actividad motora, e hipotermia (Mechoulam et al., 1995).

3.2.3. Otros ligandos endógenos con actividad cannabinoide

Además de los ligandos endógenos mencionados se ha descrito una serie de lípidos bioactivos derivados de ácidos grasos que presentan una actividad biológica similar a la de los endocannabinoides. Entre estos compuestos destacan las *N*-aciletanolaminas (NAEs) que son compuestos con una estructura química muy relacionada a la de la AEA: la *N*-oleiletanolamina (OEA), la *N*-palmitoiletanolamina (PEA), la *N*-linoleiletanolamina (LEA) y la *N*-estearoiletanolamina (SEA). A pesar de las propiedades cannabimiméticas que presentan estos compuestos sus efectos no pueden atribuirse a la activación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, ya que, en general, no se unen a ellos (Capasso et al., 2001; Conti et al., 2002; Maccarrone et al., 2002; Terrazzino et al., 2004). Se ha propuesto que estos lípidos ejercerían un efecto denominado *entourage*, es decir, modifican la acción de los endocannabinoides incrementando su acción biológica. Esta capacidad es consecuencia de que estos lípidos comparten con la AEA las vías de síntesis y, sobre todo, de degradación, siendo sustratos de la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*). De esta forma, al ocupar la actividad de esta enzima, retrasan la degradación de la AEA, haciendo así más prolongados sus efectos (Fowler, 2003, 2004; Lambert y Di Marzo, 1999). Por otro lado, la OEA también puede mediar sus efectos a través de la activación del receptor huérfano GPR119 (Overton et al., 2006), del receptor TRPV1 (Ahern, 2003) o del receptor nuclear PPAR- α (Fu et al., 2003; Guzmán et al., 2004). La PEA es capaz de ejercer sus acciones a través de la activación del receptor PPAR- α (Citraro et al., 2013; Lo Verme et al., 2005).

De forma reciente, se han descrito también varios monoacilgliceroles de ácidos grasos diferentes al araquidónico que presentan cierta actividad cannabinoide como son el 2-oleilglicerol (2-OG) y el 2-linoleoilglicerol (2-LG). Estos lípidos, estructuralmente relacionados con el endocannabinoide 2-AG, ejercen sus funciones en el organismo mediante la activación del receptor GPR119 (Hansen et al., 2011; Silvestri y Di Marzo, 2013).

3.3. Metabolismo de los endocannabinoides

Se ha propuesto que los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de endocannabinoides ejercen un importante papel regulador del sistema cannabinoide endógeno (Leung et al., 2006; Marsicano y Lutz, 2006; Pagotto et al., 2006). Los procesos por los que se sintetizan, liberan y degradan la AEA y el 2-AG son los más estudiados hasta el momento. Respecto a los demás endocannabinoides descritos, no existen todavía datos concluyentes sobre los diferentes mecanismos implicados en el metabolismo de los mismos, pero se ha postulado que comparten mecanismos con los endocannabinoides AEA y 2-AG (Fezza et al., 2002).

3.3.1. Síntesis de endocannabinoides

La entrada de calcio al interior de la célula constituye la señal que provoca la síntesis y liberación de AEA y de otras NAEs. Dicha síntesis se produce por la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina (PE) presente en la membrana celular mediante la acción sucesiva de dos enzimas. En primer lugar, a partir de la PE y un glicerofosfolípido se forma el precursor *N*-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE), reacción catalizada por una *N*-aciltransferasa (NAT) dependiente de calcio. En segundo lugar, se produce la hidrólisis de NAPE por acción de una fosfolipasa D (PLD, del inglés *phospholipase D*) específica dependiente también de calcio (NAPE-PLD), produciendo ácido fosfatídico y AEA. Una vez sintetizada, la AEA es liberada al espacio extracelular, por un mecanismo aún no dilucidado totalmente, en donde puede actuar de forma autocrina o paracrina (Piomelli et al., 2000) (

Figura 6).

Cabe destacar que estudios en ratones *knockout* para la NAPE-PLD han revelado que estos animales poseen concentraciones de AEA similares a las que presentan los ratones *wildtype*, sugiriendo la existencia de rutas enzimáticas alternativas para la producción de la AEA *in vivo* (Okamoto et al., 2007; Simon y Cravatt, 2010). En este sentido, se ha descrito que la AEA se puede sintetizar también a partir de la hidrólisis de NAPE por una fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*), produciéndose fosfo-anandamida, que sería posteriormente desfosforilada por fosfatasa como la inositol 5'fosfatasa SHIP1 o la tirosina fosfatasa PTPN22 (Liu et al., 2008). Por otro lado, la AEA se puede producir por una doble desacilación de NAPE mediante la alfa, beta-hidrolasa 4 (ABHD4) (Simon y Cravatt, 2006) y posterior hidrólisis del *N*-araquidonoilfosfoglicérido produciéndose anandamida y glicerol-fosfato (Liu et al., 2008).

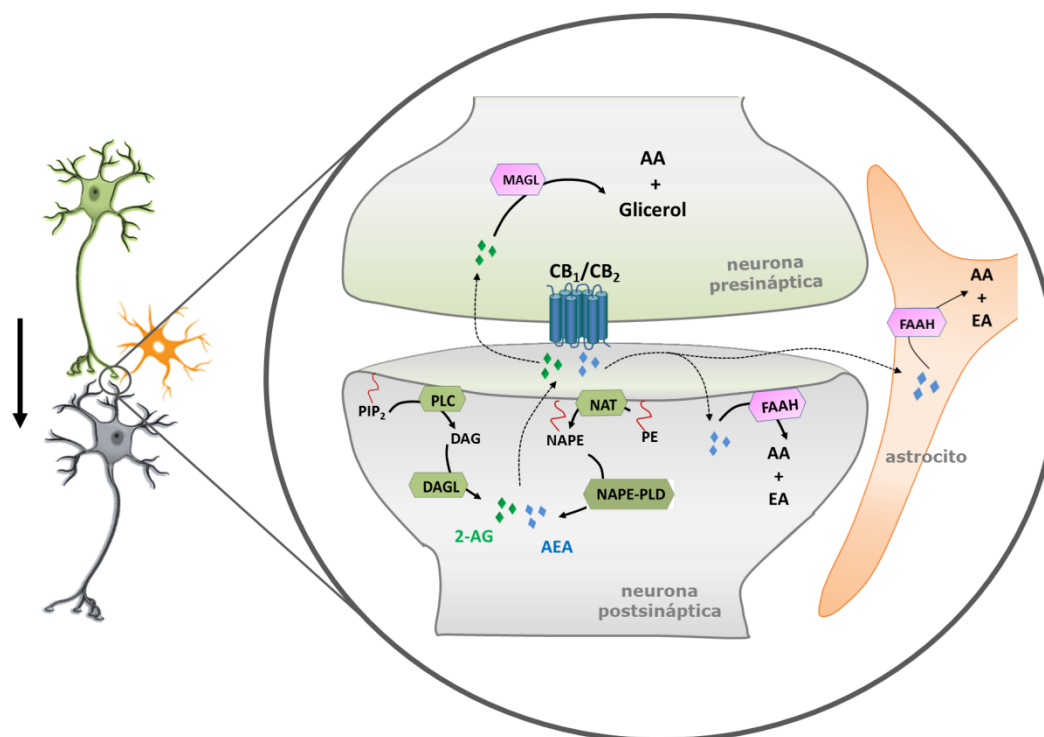


Figura 6. Esquema de los principales mecanismos de síntesis y degradación de AEA y 2-AG en el SNC. DAGL, diacilglicerol lipasa; EA, etanolamina; FAAH, amido hidrolasa de ácidos grasos; MAGL, monoacilglicerol lipasa; NAT, *N*-aciltransferasa; NAPE, *N*-araquidonilfosfatidiletanolamina; NAPE-PLD, *N*-araquidonil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D; PE, fosfatidiletanolamina; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PLC, fosfolipasa C.

La síntesis del 2-AG, en la mayoría de los casos, se activa también por la entrada de calcio al interior de la célula, vía canales Ca^{2+} dependientes de voltaje. Su biosíntesis tiene lugar de forma independiente a la de la AEA. La ruta más probable de formación del 2-AG y otros 2-monoacilglicéridos está mediada de manera mayoritaria por la acción de una fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidilinositol-bis-fosfato (PIP₂, del inglés *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), presente en la membrana celular, generando diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico. Después, la actuación de una diacilglicerol lipasa (DAGL) sobre el DAG, libera la molécula del endocannabinoide (Bisogno et al., 2005) (

Figura 6). Se han propuesto algunas otras vías alternativas que podrían igualmente generar 2-AG, aunque sólo actuarían en determinadas circunstancias (Muccioli, 2010).

3.3.2. Proceso de finalización de la señal biológica

Una vez liberados al medio extracelular, la acción de los endocannabinoides viene determinada por dos procesos que limitan su disponibilidad: la del transporte desde la hendidura sináptica hacia el interior de la célula (recaptación) y la hidrólisis posterior provocada por dos sistemas enzimáticos, la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Cravatt et al., 1996) y la lipasa de monoacilglicéridos (MAGL) (Dinh et al., 2002).

3.3.7.1. Transporte de endocannabinoides

Existen bastantes evidencias que indican que la recaptación de la AEA al interior celular se realiza través de un proceso de difusión facilitada mediado por una proteína transportadora (AMT), aunque esta proteína todavía no ha podido ser aislada y tampoco se ha podido clonar el gen que la codifica. Esta hipótesis se basa en los datos que indican que el transporte de AEA es un proceso saturable, competitivo, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de adenosin trifosfato (ATP), así como que es susceptible de ser inhibido de forma específica (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997; Di Marzo et al., 1994). En los últimos años se ha postulado que la AEA se transporta al interior celular por unión a las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs), específicamente a las proteínas FABP5 y FABP7 (Kaczocha et al., 2009) y más recientemente se ha propuesto que este transporte se realiza por una variante truncada de la enzima hidrolasa de ácidos grasos, denominada FLAT (del inglés *FAAH-like anandamide transporter*) (Fu et al., 2012). Sin embargo, aún no se ha logrado la caracterización molecular de la AMT. Por ello, algunos autores mantienen, basándose en el carácter lipofílico de la AEA, que no se precisa de un transportador para atravesar la membrana celular, sino que podrían difundir a través de ella, como lo hacen los ácidos grasos de cadena larga. Estos autores consideran que la degradación de la AEA en el interior celular podría ser suficiente para establecer un gradiente químico, que facilitara la direccionalidad de la difusión de este compuesto desde el espacio extracelular (Glaser et al., 2003). Así mismo, también se ha propuesto que el proceso de recaptación de AEA se puede deber a un mecanismo de endocitosis tras su concentración en balsas lipídicas ricas en caveolina (Dainese et al., 2007; McFarland et al., 2004).

A diferencia de los numerosos estudios sobre la recaptación de anandamida, existe poca información sobre la recaptación de 2-AG. Sin embargo, varios trabajos sugieren que 2-AG y AEA son transportados por el mismo sistema (Beltramo y Piomelli, 2000; Bisogno et al., 2001).

3.3.7.2. Degradación de endocannabinoides

Una vez en el interior de la célula, los endocannabinoides son degradados a través de una o varias reacciones enzimáticas, produciéndose así su inactivación. La AEA es metabolizada por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (Cravatt et al., 1996) dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina (

Figura 6). La FAAH es una enzima integral de membrana con actividad serin-hidrolasa que se expresa de forma abundante en varios órganos, entre ellos el cerebro (Kano et al., 2009). La distribución de FAAH es complementaria a la del receptor CB₁ (Egertová et al., 1998; Ueda et al., 2000). Los mayores niveles para esta enzima aparecen, en humanos, en corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, médula espinal, tronco encefálico y cerebelo (Romero et al., 2002a).

En el cerebro, la enzima FAAH se localiza de forma postsináptica en neuronas de gran tamaño (como por ejemplo, las células piramidales de corteza cerebral e hipocampo y las células de Purkinje en el cerebelo) y en células de glía, específicamente en astrocitos (Romero et al., 2002b; Tsou et al., 1998a). La especificidad de sustrato de esta enzima es amplia produciendo la hidrólisis de varias amidas de ácidos grasos e incluso monoacilglicerol (Goparaju et al., 1998), lo que sugiere que esta enzima es un elemento clave desde un punto de vista regulador en el metabolismo de los endocannabinoides (Labar y Michaux, 2007).

Aunque el 2-AG es también sustrato de la FAAH (Goparaju et al., 1998), la degradación de este endocannabinoide se realiza mayoritariamente por la enzima monoacilglicerol lipasa (Dinh et al., 2002). La enzima MAGL es una serin-hidrolasa que degrada 2- y 1- monoacilglicerol produciendo el ácido graso correspondiente y glicerol (

Figura 6). Experimentos de *Northern-blot* e hibridación *in situ* revelan que el ARNm de la enzima MAGL se expresa de forma heterogénea en el cerebro, encontrándose los niveles más altos en las regiones donde el receptor CB₁ está también presente, como el hipocampo, corteza cerebral, tálamo y cerebelo. La enzima MAGL se localiza en los terminales presinápticos de las neuronas (Dinh et al., 2002).

3.3.7.3. Endocannabinoides como precursores de otros lípidos bioactivos

Existen estudios que demuestran que tanto la AEA como el 2-AG pueden ser metabolizados por otras enzimas que participan en el metabolismo de eicosanoides, como por ejemplo, varias ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y enzimas del complejo citocromo P450 (Guindon y Hohmann, 2008; Zelasko et al., 2015). Estas reacciones enzimáticas no se consideran estrictamente reacciones de degradación ya que, aun siendo procesos que conducen a la inactivación parcial o completa de estos endocannabinoides, son también procesos que generan una gran cantidad de moléculas activas sobre otras dianas moleculares (Guindon y Hohmann, 2008).

Se ha descrito que la AEA puede ser sustrato de la enzima COX-2, transformándose en prostaglandina E2-etanolamida, también denominada prostamida E2. Este metabolito se une con diferente potencia a los receptores para prostaglandinas E2 (PGE2) (Ross et al., 2002). La AEA se puede metabolizar también por diferentes LOX, como la 12 y 15-LOX, produciendo 12/15-(S)hidroxi-eicosatetraenoiletanolamida, unos metabolitos que se ha descrito podrían activar a los receptores vanilloides (Pertwee y Ross, 2002). En cuanto al otro endocannabinoide, el 2-AG, la enzima COX-2 puede transformarlo en prostaglandina éster de glicerol E2 (PGE2-G), un compuesto precursor que produce hiperalgesia *in vivo* (Hu et al., 2008). Las LOX también tienen la capacidad de metabolizar al 2-AG, dando lugar a metabolitos que se comportan como ligandos de receptores nucleares, como por ejemplo el receptor PPAR- α (Kozak et al., 2002; Moody et al., 2001).

Por otro lado, la oxigenación enzimática de la AEA y del 2-AG por enzimas dependientes del citocromo P-450 genera distintos epóxidos (ácido epoxieicosatetraenoico, EET) e hidroxiácidos (ácido hidroxi-eicosatetraenoico, HETE) (Zelasko et al., 2015). Estos productos derivados del metabolismo de AEA y 2-AG, tienen diversas propiedades biológicas como regulación de la viabilidad celular, movilización de calcio y modulación de la transmisión sináptica (Fowler, 2007).

3.4. Farmacología del sistema cannabinoide endógeno

Los estudios que relacionan la estructura de los cannabinoides con su actividad farmacológica han permitido sintetizar moléculas con una conformación capaz de actuar de forma selectiva sobre algunas moléculas diana del sistema cannabinoide endógeno. Entre estos compuestos destacan aquellos que son capaces de unirse de manera selectiva a los receptores

cannabinoides o modular alostericamente su actividad así como moléculas capaces de modificar los niveles de los endocannabinoides, regulando el llamado “tono endocanabinoide”. Estos ligandos han sido de gran utilidad en el estudio de la farmacología e implicación fisiológica del sistema canabinoide endógeno.

3.4.1. Agonistas de los receptores cannabinoides

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides, es decir, activadores de las respuestas mediadas por estos. Los agonistas cannabinoides se pueden clasificar, en función de su estructura química, en cuatro grupos de compuestos: cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y derivados eicosanoides (Howlett et al., 2002) (

Figura 7).

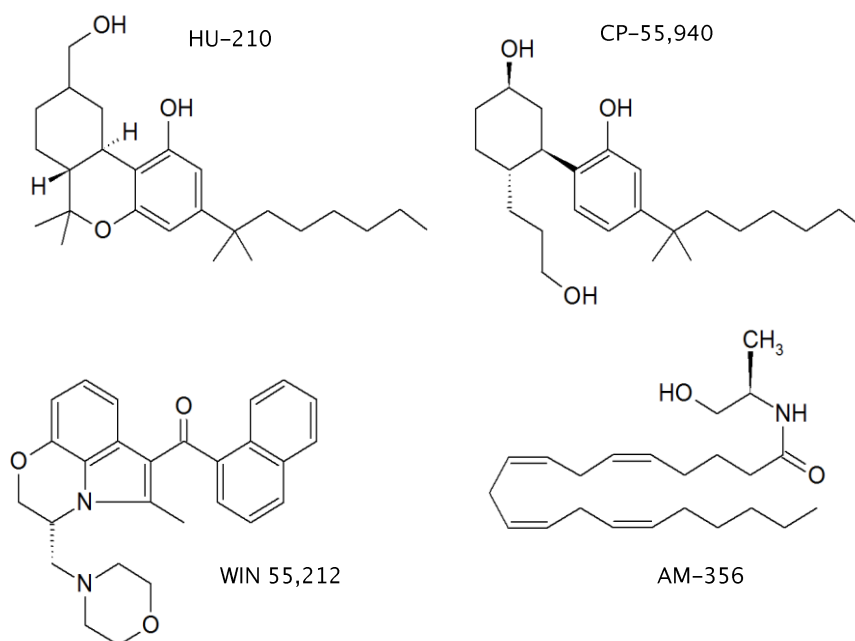


Figura 7. Ejemplos de agonistas cannabinoides sintéticos. HU-210, cannabinoide clásico con estructura de dibenzopirano; CP-55,940, cannabinoide no clásico con estructura de ciclohexilfenol; WIN 55,212, cannabinoide aminoalquilindol; AM-356, cannabinoide eicosanoide.

3.4.1.1. Cannabinoides clásicos

Al grupo de cannabinoides clásicos pertenecen los cannabinoides botánicos, como el Δ^9 -THC o el CBN, y sus análogos estructurales sintéticos. Entre estos compuestos con estructura de dibenzopirano destacan los agonistas de los receptores cannabinoides 11-hidroxi-8-THC-dimetilheptilo (HU-210) (Howlett et al., 1990), 11-hidroxi-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243) (Howlett et al., 1990) y Nabilona (Lemberger y Rowe, 1975), entre otros.

3.4.1.2. Cannabinoides no clásicos

Los cannabinoides no clásicos constituyen un grupo de compuestos formado por análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC pero que carecen del anillo de pirano. Algunos ejemplos de este tipo de cannabinoides son los desarrollados por la compañía Pfizer, entre ellos el CP-55,940 (Fouda et al., 1987) o el Levonantradol (CP 50,556-1) (Milne et al., 1979), ambos agonistas no selectivos de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂.

3.4.1.3. Aminoalquilindoles

En el grupo de los aminoalquilindoles, se incluyen moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina, es decir, son compuestos que no están relacionados estructuralmente con los cannabinoides botánicos pero muestran un perfil farmacológico cannabimimético. El cannabinoide de referencia en este grupo es el WIN-55,212-2. Este cannabinoide fue desarrollado en los años 90 por la farmacéutica americana Sterling Winthrop (D'Ambra et al., 1992) y se caracteriza por presentar una alta afinidad y eficacia en su interacción con ambos tipos de receptores cannabinoides, aunque exhibe cierta selectividad por los receptores CB₂. Otros cannabinoides del grupo de los aminoalquilindoles son el 1-propil-2-metil-3-(1-naftoil) indol (JWH-015) (Huffman et al., 2006) y el (1-(2,3-diclorobenzoil)-2-metil-5-metoxi-3-(2-[1-morfolino] etil) indol) (L-768,242 o GW405833) (Gallant et al., 1996).

3.4.1.4. Derivados eicosanoides

Al último gran grupo de cannabinoides de síntesis química, el de los eicosanoides, pertenecen los cannabinoides que derivan estructuralmente de los endocannabinoides producidos por las células de origen animal. La modificación de la estructura de la AEA ha permitido desarrollar la primera generación de agonistas selectivos para los receptores CB₁, entre este tipo de compuestos destacan, en menor proporción, la metanandamida (AM-356), un derivado mucho más estable que la AEA a la hidrólisis enzimática (Abadji et al., 1994), pero sobre todo la araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA) o la araquidonoilciclopropilamida (ACPA) (Hillard et al., 1999).

3.4.2. Antagonistas de los receptores cannabinoides

Los estudios de estructura-actividad también han permitido el desarrollo de antagonistas selectivos para los receptores cannabinoides, algo que durante mucho tiempo se intentó a partir de agonistas parciales pero que no se pudo conseguir hasta mitad de los años 90. Estos son compuestos que bloquean las respuestas mediadas por los receptores a los que se unen por lo que han representado una herramienta farmacológica muy útil para identificar el tipo de receptor implicado en los diferentes efectos de los cannabinoides. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son el SR141716A (Rimonabant) (Rinaldi-Carmona et al., 1994) y el SR144528 (Rinaldi-Carmona et al., 1998), que fueron los dos primeros compuestos sintetizados con actividad antagonista selectiva para los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente. Posteriormente se

desarrollaron otros como el AM251 (específico del receptor CB₁) y el AM630 (específico del receptor CB₂).

3.4.3. Modificadores del tono endocannabinoide

El descubrimiento de la maquinaria de síntesis y degradación de endocannabinoides ha permitido desarrollar una serie de compuestos capaces de potenciar el tono cannabinoide endógeno al actuar sobre algunas moléculas diana de este sistema implicadas en la inactivación de los endocannabinoides. Ejemplos de los mismos son el fluoruro de palmitilsulfonilo AM374 (Gifford et al., 1999) y el AM404 (Beltramo et al., 1997), inhibidores de la FAAH y del transportador que media la recaptación de AEA respectivamente. Aunque en el caso del AM404, se encontraron posteriormente otros efectos farmacológicos como la activación de los receptores TRPV1. Posteriormente a esto, se han desarrollado otros inhibidores de la FAAH (URB). De la MAGL (URB) y del transportador (VDM1, ODM1, ODM2 y UCM707).

Dentro de la categoría de modificadores del tono endocannabinoide se podrían incluir también algunos moduladores alostéricos de los receptores cannabinoides, principalmente del receptor CB₁, que han sido desarrollados y caracterizados de forma reciente (Pertwee and Ross, 2002). Su activación permitiría intensificar, pero también atenuar, la acción de los endocannabinoides a través de sus receptores.

3.5. Mecanismos de señalización celular acoplados a los receptores cannabinoides

Como se ha indicado antes en el caso de los ligandos cannabinoides la mayor parte de los efectos de los cannabinoides están mediados por la activación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, ambos receptores de tipo GPCR. Los receptores cannabinoides están acoplados a diferentes sistemas efectores que modulan rutas de señalización intracelular de gran importancia como la vía de la adenilato ciclasa (AC), diferentes canales iónicos y varias cascadas de proteínas quinasas, como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y la vía de la proteína quinasa B (Akt) (Demuth y Molleman, 2006). Recientemente, también se ha descrito la capacidad de los receptores cannabinoides de señalizar a través de la formación de dímeros con otros GPCR (Callén et al., 2012; Carriba et al., 2007; Martínez-Pinilla et al., 2014; Navarro et al., 2008; Rios et al., 2006).

Algunos cannabinoides son también capaces de actuar de manera independiente de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, activando otros receptores celulares como: (i) el receptor vanilloide TRPV1 (Zygmunt et al., 1999), lo que permite efectos a nivel de la conductancia iónica; (ii) el receptor huérfano GPR55 (Ryberg et al., 2007), quien es también un receptor metabotrópico como el receptor CB₁ y el receptor CB₂, pero que regularía diferentes rutas intracelulares y (iii) los receptores nucleares de la familia PPAR (Sun y Bennett, 2007), con la capacidad de modular diferentes factores de transcripción que producen la expresión/inhibición de determinados genes. Este conjunto de mecanismos celulares (cambios en la conductancia iónica, regulación de mensajeros intracelulares y/o modulación de factores de transcripción, constituye el conjunto de mecanismos por los cual los endocannabinoides regulan algunos de los procesos clave de la

función celular. Las principales vías reguladas por los receptores CB_1 y CB_2 se muestran en el esquema de la

Figura 8.

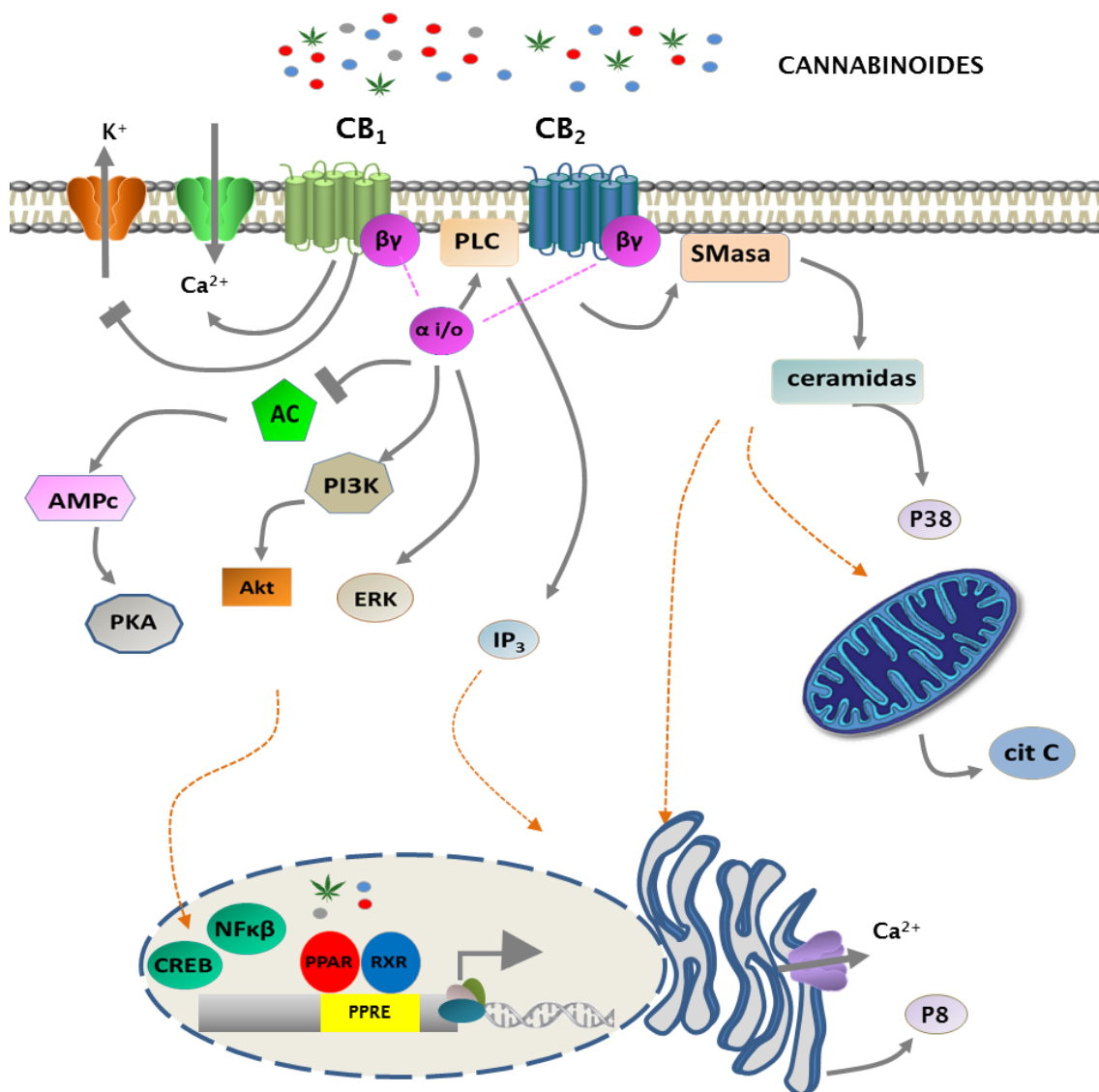


Figura 8. Vías de señalización mediadas por los cannabinoides a través de los receptores CB_1 y CB_2 . La activación de los receptores CB_1 da lugar, a través de la proteína $G_{i/o}$, a una inhibición de la vía de la adenilato ciclasa (AC), la regulación de diferentes canales iónicos, la activación de la ruta de las MAPK y la fosfolipasa C (PLC), entre otros. La activación del receptor CB_2 también inhibe la AC y produce la activación de la vía de las MAPK, además, la activación del receptor CB_2 produce la síntesis de ceramidas, las cuales inducen una respuesta del retículo endoplásmico y de la mitocondria responsable de inducir señales intracelulares, como la liberación de la proteína de estrés p8y citocromo c, que conducen a la muerte celular. A través de los receptores CB_1 y CB_2 , los cannabinoides pueden controlar además la expresión de algunos genes como BDNF así como modular los factores de transcripción CREB y NF κ B, entre otros. Los cannabinoides pueden regular también la expresión génica a través de la activación de los receptores nucleares PPAR.

3.5.1. Mecanismos de transducción de señales mediados por el receptor CB₁

La mayor parte de los efectos de los cannabinoides, tanto sobre el sistema nervioso central como sobre diversas localizaciones periféricas, están mediados por el receptor CB₁. La activación de los receptores CB₁ produce, a través de la proteína inhibitoria G_{i/o}, la inhibición de la AC. Esto ocasiona un descenso de los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y, por consiguiente, una disminución de la capacidad de fosforilación de proteínas quinasas dependientes de AMPc, (proteína quinasa A, PKA, del inglés *protein kinase A*) (Davis et al., 2003). Sin embargo, y bajo determinadas circunstancias, el receptor CB₁ es también capaz de acoplarse a proteínas Gs, dando lugar a una acumulación del AMPc (Demuth y Molleman, 2006; Glass y Felder, 1997). Esta dualidad en su acción sobre los niveles de AMPc podría estar basada en las diferentes conformaciones del receptor CB₁ dependientes de las distintas afinidades hacia las proteínas G de los diferentes agonistas (Clarke, 2005; Glass y Northup, 1999).

Los cannabinoides, a través del receptor CB₁ y de la proteína Gi/o (Lograno y Romano, 2004) (Lograno y Romano, 2004) o a través de Gq/11 (Lauckner et al., 2005), también pueden regular a otros sistemas efectores como la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima, localizada en la membrana plasmática, hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) dando lugar a la formación de los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP₃, del inglés *inositol trisphosphate*) y diacilglicerol (DAG) (Mombouli et al., 1999; De Petrocellis et al., 2007) que producen un aumento en la concentración intracelular de calcio por activación de los receptores de IP₃ del retículo endoplasmático y la activación de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*) respectivamente (Howlett y Mukhopadhyay, 2000; Netzeband et al., 1999).

Además de las vías de señalización anteriores, los cannabinoides también activan a través del receptor CB₁ varias cascadas de MAP quinasas como p44/42 (Davis et al., 2003), JNK, p38 (Herrera et al., 2005; Liu et al., 2000; Rueda et al., 2000) o la vía de la quinasa de supervivencia Akt, (Gómez del Pulgar et al., 2000; Molina-Holgado et al., 2002). De este modo los receptores CB₁ pueden regular vías de señalización características de neurotrofinas y factores de crecimiento como NGF, BDNF o EGF (Butovsky et al., 2005; Sánchez et al., 2003) y tienen un papel importante en la regulación en los procesos de supervivencia celular.

Los receptores CB₁ son también capaces de regular proteínas G monoméricas como Rap1 y Rho, o tirosina quinasas citosólicas como Src (He et al., 2005; Mahavadi et al., 2014). Todos estos y otros mecanismos de señalización participan en el control de muchas funciones celulares importantes como la proliferación, diferenciación y apoptosis (Bouaboula et al., 1995; Galve-Roperh et al., 2008).

Por otro lado, la activación del receptor cannabinoide CB₁ es capaz de aumentar la expresión de óxido nítrico (NO, del inglés *nitric oxide*) a través de la activación de la óxido nítrico sintasa constitutiva dependiente de calcio (cNOS, del inglés *constitutive nitric oxide synthase*) (Fimiani et al., 1999). El NO producido de forma constitutiva actúa como un represor de la expresión de NFκB (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), un factor de transcripción que está implicado en la regulación de varios genes de inflamación como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*) y la interleuquina de tipo 6 (IL-α6) (Fimiani et al., 1999). También se ha visto que los cannabinoides pueden atenuar la inducción de iNOS ejercida por estímulos proinflamatorios (Esposito et al., 2006).

Los receptores CB₁, además, pueden modular el metabolismo de esfingolípidos aumentando los niveles de ceramida por activación de la enzima esfingomielinasa (SMasa) (Gómez del Pulgar et al., 2002; Sánchez et al., 1998). La acumulación de ceramida induce una respuesta de estrés en el retículo endoplásmico que desencadena la inducción sucesiva de la proteína de estrés p8, los factores de transcripción ATF-4 y CHOP y la pseudoquinasa TRB3, implicados en los procesos de muerte celular (Galve-Roperh et al., 2008).

Por último, los cannabinoides, a través de los receptores CB₁ y también CB₂ pueden controlar la expresión de genes de expresión temprana como Krox-24 (Bouaboula et al., 1995, 1996) así como modular los factores de transcripción CREB/ATF, Fos y NFκB, entre otros (Herring et al., 1998; Kaminski, 1998), aunque es posible que en este tipo de modulación también participe la señal de los cannabinoides mediada por los receptores nucleares de la familia PPAR.

Debido a la gran diversidad de mecanismos de señalización a los que el receptor CB₁ puede estar acoplado, se ha postulado que el efecto estimulador o inhibidor, en una determinada vía de señalización podría depender del contexto celular (tejido donde esté situado el receptor, localización presináptica/postsináptica, tipo de ligando y patofisiología).

3.5.2. Mecanismos de transducción de señales mediados por el receptor CB₂

La activación del receptor CB₂ conlleva efectos inhibitorios a nivel del sistema de la adenilato ciclasa/AMPC, (Felder et al., 1995; Pacher et al., 2006) así como estimulación de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (ERK, JNK y p38) (Felder et al., 1995) y la vía de la PI3K-Akt (Sánchez et al., 2003). Además, produce un aumento de la concentración de calcio intracelular través de la vía PLC-IP₃ (Zoratti et al., 2003). Hasta hace poco no parecía que el receptor CB₂ modulase canales iónicos (Felder et al., 1995; McAllister et al., 1999; Pertwee, 1997), pero recientemente, se ha descrito que la estimulación del receptor CB₂ en miocitos ventriculares de rata puede modular la conductancia de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Li et al., 2012). La activación del receptor CB₂ produce una disminución de la expresión de las enzimas pro-inflamatorias ciclooxigenasa de tipo 2 (COX-2) e iNOS, (Castillo et al., 2010).

3.5.3. Mecanismos de transducción de señales mediados por heterómeros de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂

Además de los mecanismos de transducción de señales mencionados anteriormente es importante destacar que en algunas estructuras cerebrales los receptores CB₁ pueden formar heterómeros con otros receptores que también están acoplados a proteínas G y que utilizan sistemas efectores similares, como los receptores opioides de tipo μ , adenosina A_{2A}, dopaminérgicos D1 y D2, angiotensina AT1 y también otros receptores cannabinoides como CB₂ y GPR55, de forma que se ha propuesto que estos receptores interaccionan entre ellos formando heterómeros (Callén et al., 2012; Carriba et al., 2007; Martínez-Pinilla et al., 2014; Navarro et al., 2008; Rios et al., 2006). Los heterómeros de receptores GPCR son complejos macromoleculares con características funcionales propias, que pueden ser diferentes a las de los receptores que los constituyen. Así, la oligomerización constituye un mecanismo por el cual un mismo GPCR puede presentar funcionalidades diferentes y específicas (Ferré et al., 2009). En esta Tesis se hace énfasis en la

formación de heterómeros del receptor CB_1 con los receptores de adenosina A_{2A} y con los receptores CB_2 .

3.5.3.1. Heterómeros CB_1 - A_{2A}

Los receptores A_{2A} y CB_1 se codistribuyen en varias áreas del SNC, como el estriado, cerebelo, hipocampo y corteza cerebral (Herkenham et al., 1991a; Svenningsson et al., 1999). A través de aproximaciones *in vitro* e *in vivo* se ha detectado la existencia de interacciones moleculares y funcionales entre ambos receptores en el estriado y globo pálido de rata y en células transfectadas (Carriba et al., 2007). Se ha descrito que la formación del heterómero CB_1 - A_{2A} juega un papel relevante en varios de los efectos bioquímicos de los receptores CB_1 . En este sentido, se ha observado que en células de neuroblastoma humano la señalización del receptor CB_1 es totalmente dependiente de la activación de los receptores A_{2A} . Es decir, en estas células, la estimulación del receptor CB_1 sólo produce una disminución en los niveles de AMPc si los receptores A_{2A} son simultáneamente coactivados (Carriba et al., 2007). Esto indica que la activación de los receptores A_{2A} en el complejo heterodimérico CB_1 - A_{2A} permite el acoplamiento eficaz de los receptores CB_1 a proteínas $G_{i/o}$. No obstante, hay que señalar que otros autores encontraron que el bloqueo génico de los receptores A_{2A} no perjudica la capacidad de los agonistas cannabinoides de activar las proteínas $G_{i/o}$ (Soria et al., 2004). De forma análoga, en células transfectadas únicamente con el receptor CB_1 se observa que este receptor se acopla y activa a proteínas $G_{i/o}$, provocando una inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina (Felder et al., 1996; Hillard et al., 1999). Se ha sugerido que es en presencia del receptor A_{2A} (cuando se forma el heterómero CB_1 - A_{2A}) que la funcionalidad del receptor CB_1 depende de la activación del receptor A_{2A} . Esto no descarta, sin embargo, que existan vías de señalización del receptor CB_1 independientes de la proteína $G_{i/o}$ que no dependan del receptor A_{2A} (Carriba et al., 2007).

3.5.3.2. Heterómeros CB_1 - CB_2

Mediante técnicas biofísicas y bioquímicas se ha identificado la formación de heterómeros entre los receptores CB_1 y CB_2 en células neuronales transfectadas y en cerebro de rata en el núcleo acumbens y globo pálido (Callén et al., 2012). Estos estudios demuestran que la coactivación con agonistas de ambos receptores da lugar a una interacción negativa en la fosforilación de la proteína Akt. Además, se ha demostrado que el tratamiento con antagonistas de los receptores CB_2 puede bloquear el efecto de los agonistas CB_1 y viceversa dando lugar a un fenómeno de antagonismo cruzado bidireccional. Estos datos sugieren que, incluso aunque los niveles de expresión sean bajos, el papel de los receptores CB_2 sería relevante, ya que podrían inhibir la señalización de los receptores CB_1 en zonas específicas (Callén et al., 2012).

3.5.4. Mecanismos de transducción de señales mediados por receptores distintos a los receptores CB₁ y CB₂

Además de a los receptores CB₁ y CB₂, algunos endocannabinoides pueden unirse a otro tipo de receptores, como es el receptor huérfano GPR55. Al ser activado, el receptor GPR55 se une a proteínas Gα13 (Ryberg et al., 2007), aunque también se puede unir a Gq o Gα12 (Lauckner et al., 2008). A través de estas vías, los cannabinoides producen la activación de varias vías de señalización entre las que se incluyen, por ejemplo, la vía de las MAPK, la activación de la PKC, el aumento de la concentración de calcio intracelular mediado a través de la vía PLC/IP₃ y de proteínas G pequeñas como rhoA, cdc42 y rac1 y la activación de varios factores de transcripción como NFAT o NFκB (Balenga et al., 2011; Henstridge et al., 2009, 2010; Kapur et al., 2009; Lauckner et al., 2008; Waldeck-Weiermair et al., 2008). Otro receptor con actividad cannabimimética, el receptor GPR119, está acoplado a proteínas Gs, dando lugar tras su activación, a un aumento en la concentración de AMPc intracelular (Godlewski et al., 2009). En cuanto al receptor vanilloide TRPV1, es un canal catiónico no selectivo permeable a Na⁺, Ca²⁺ y H⁺, por lo tanto, su activación produce un aumento en la concentración de calcio intracelular (Roberts et al., 2002). Algunos cannabinoides como la AEA pueden funcionar como ligandos de este receptor, mientras que algunos derivados moleculares del ácido araquidónico como NADA se comportan como ligandos selectivos (Bisogno et al., 2000). Por último, la activación de los receptores nucleares PPARs por los cannabinoides regula la expresión génica de un conjunto de genes, como por ejemplo, el factor NFκB, el gen de la iNOS o la COX-2, entre otros (Stahel et al., 2008; Sun et al., 2006). Algunos fitocannabinoides como el CBD y el Δ⁹-THC, o los endocannabinoides AEA y 2-AG pueden unirse a los receptores PPAR.

3.6. Modulación de la transmisión nerviosa por los endocannabinoides

Los datos obtenidos en cuanto a la contribución de los endocannabinoides en procesos tales como la inhibición de la liberación de neurotransmisores, la diferenciación neuronal y la supervivencia neuronal (Derkinderen et al., 1996; Galve-Roperh et al., 2008; Rueda et al., 2002) han sugerido que el sistema cannabinoide endógeno es un regulador homeostático importante que garantiza un ajuste fino de la información procesada en el cerebro y proporciona mecanismos de regulación destinados a preservar la estructura y la función de los circuitos cerebrales (Castillo et al., 2012). El principal mecanismo por el cual los endocannabinoides regulan la función sináptica es a través de la señalización retrógrada (Kano et al., 2009).

El papel de los endocannabinoides como mensajeros retrógrados comienza tras la llegada del impulso nervioso y la despolarización al botón terminal sináptico, señal que produce la liberación del neurotransmisor. La unión del neurotransmisor a su receptor postsináptico produce la entrada de calcio en el elemento postsináptico y con ella la síntesis de endocannabinoides a partir de precursores lipídicos. Tras la difusión del endocannabinoide a través de la membrana plasmática hacia el espacio sináptico y unión del endocannabinoide al receptor CB₁ en el terminal presináptico se produce, mediante la inhibición presináptica de canales de calcio y/o activación de canales de potasio, la inhibición de la liberación del neurotransmisor (Di Marzo et al., 1994, 1998) (

Figura 9). Así, los endocannabinoides son compuestos que son sintetizados bajo demanda tras la llegada de diversos estímulos fisiológicos y patológicos y actúan en las proximidades del lugar donde se han liberado. Una vez han ejercido sus efectos, los endocannabinoides son transportados al interior celular donde son degradados por la acción de sistemas enzimáticos específicos.

La señalización retrógrada de las moléculas endocannabinoides está ampliamente distribuida en todo el SNC, aunque parece que está más concentrada en ciertos fenotipos neuronales (neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas), dentro de regiones cerebrales particulares como el hipocampo, cerebelo, amígdala, estriado y médula espinal (Kano, 2014). Esta acción inhibitoria de los endocannabinoides permite regular la neurotransmisión de neurotransmisores clásicos, como el GABA y el glutamato (Alger, 2002; Wilson y Nicoll, 2002), cuyo exceso de actividad (inhibitoria en el caso del GABA, y excitatoria en el caso del glutamato) pueden conllevar importantes alteraciones homeostáticas, por lo que el papel de los endocannabinoides como mensajeros retrógrados puede considerarse una función de tipo protector.

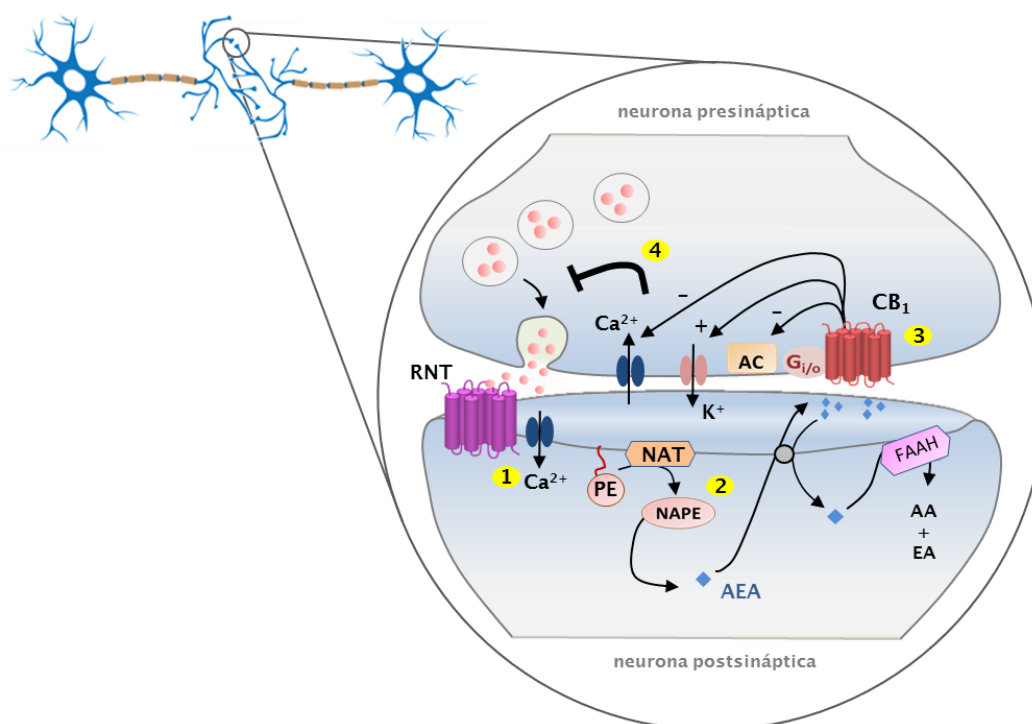


Figura 9. Mecanismo de señalización retrógrada mediado por cannabinoides. En la sinapsis la unión del neurotransmisor a su receptor produce la despolarización de la neurona postsináptica (1). Esta es la señal que induce la síntesis y liberación de endocannabinoides en la neurona postsináptica (2). Los endocannabinoides liberados activan entonces a los receptores CB₁ en los terminales presinápticos (3) e inhiben la liberación del neurotransmisor (4).

Mediante la señalización retrógrada, los endocannabinoides son capaces de participar en la regulación a corto plazo de la sinapsis, proceso conocido como supresión inducida por la despolarización (DS, del inglés *depolarization induced suppression*). Si este proceso sucede en neuronas que liberan neurotransmisores inhibidores, como el GABA, se considera una DS de la inhibición (DSI, del inglés *depolarization induced suppression of inhibition*). Si el neurotransmisor

que los endocannabinoides modulan es excitador, como el glutamato, será una DS de la excitación (DSE, del inglés *depolarization induced suppression of excitation*) (Freund et al., 2003; Wilson y Nicoll, 2002). El papel del endocannabinoide como inductor de DSE o DSI depende por tanto del tipo de neurona, pero también parece influido por ciertas condiciones basales, especialmente en relación con la concentración de calcio intracelular (Freund et al., 2003; Howlett et al., 2004).

Además de esta regulación inmediata de la transmisión sináptica, el sistema endocannabinoide participa en la plasticidad sináptica a largo plazo. Así, la señalización retrógrada mediada por endocannabinoides se ha relacionado con los fenómenos denominados depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long-term depression*) y potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long-term potentiation*). Ambas formas de plasticidad implican cambios a largo plazo en la eficacia de la transmisión sináptica en las neuronas GABAérgicas y/o glutamatérgicas (Castillo et al., 2012; Zhu, 2006). Tanto los procesos de DSE/DSI como los de LTD/LTP inducidos por los endocannabinoides se han descrito en diversas áreas cerebrales (núcleo accumbens, hipocampo, amígdala, corteza cerebral y cerebelo) y son de crucial importancia en procesos de plasticidad sináptica y contribuyen a los procesos de aprendizaje y memoria (Castillo et al., 2012; Zhu, 2006).

Además de los neurotransmisores GABA y glutamato, los endocannabinoides modulan la liberación de otros neurotransmisores como acetilcolina, serotonina, y , en menor medida, dopamina, noradrenalina, entre otros, por lo que se postula su implicación en la regulación de muchos procesos neuroquímicos (Freund et al., 2003; Howlett et al., 2002).

Por otro lado, existen evidencias que sugieren que la señalización de los endocannabinoides puede ocurrir de forma autocrina. En este tipo de señalización, los endocannabinoides sintetizados en la neurona postsináptica modulan la función neural y la transmisión sináptica mediante la activación de los receptores postsinápticos CB₁ o TRPV1. Estudios recientes también indican que los endocannabinoides pueden actuar a través de los astrocitos modulando indirectamente la función sináptica (Castillo et al., 2012; Navarrete y Araque, 2010; Navarrete et al., 2014), lo que ha llevado a considerar la comunicación astrocito-neurona como una de las principales tareas en las que está involucrado los endocannabinoides en el SNC (Navarrete y Araque, 2008, 2010; Navarrete et al., 2014).

3.7. Procesos fisiológicos mediados por los endocannabinoides en el SNC

El sistema cannabinoide endógeno está implicado en una gran variedad de procesos fisiológicos, en el sistema nervioso central y periférico (Irving et al., 2002), en el sistema inmune (Cabral y Staab, 2005) y cardiovascular (Pacher y Steffens, 2009), así como a nivel del metabolismo energético y a nivel endocrino. En el SNC, la mayoría de las acciones fisiológicas de los cannabinoides parecen estar mediados por la activación del receptor CB₁, aunque tampoco se descarta que algunos de estos efectos centrales de los cannabinoides puedan estar mediados total o parcialmente por los receptores CB₂ (Morgan et al., 2009; Onaivi et al., 2012) e incluso a través de mecanismos alternativos (Castillo et al., 2012). El sistema cannabinoide endógeno participa en la modulación de procesos controlados desde áreas del SNC donde el receptor CB₁ es especialmente abundante. Entre estos procesos destacan el control de la actividad motora (que se corresponde con una alta densidad de los receptores CB₁ en ganglios basales y cerebelo) (Howlett et al., 2002; Di Marzo et al., 2000), nocicepción (áreas espinales y supraespinales) (Cravatt y Lichtman, 2004),

memoria y aprendizaje (corteza cerebral e hipocampo) (Riedel y Davies, 2005), emociones (amígdala) (Martin et al., 2002), y diversas funciones neuroendocrinas (hipotálamo) (Ameri et al., 1999; Pagotto et al., 2006), entre otros (Tabla 3). Además, el sistema cannabinoide endógeno regula la supervivencia neuronal (Galve-Roperh et al., 2008), participando en varios mecanismos de neuroprotección del SN, como por ejemplo el control de la hiperexcitabilidad (Marsicano et al., 2003) e inflamación (Ashton y Glass, 2007; Kaplan, 2013). Estos, y otros mecanismos neuroprotectoras de los cannabinoides, están mediados por los receptores CB₁, presentes en neuronas y en células gliales, pero también por los receptores CB₂ (Ashton y Glass, 2007; Kaplan, 2013; Marsicano et al., 2002, 2003; van der Stelt y Di Marzo, 2005).

Tabla 3. Principales procesos fisiológicos en los que participa el sistema cannabinoide endógeno en el SNC. Los cannabinoides, a través de los receptores CB₁, regulan numerosos procesos esenciales en el SNC como la actividad motora, la nocicepción, la regulación neuroendocrina o la supervivencia de células neurales, entre otros.

PROCESO	FUNCIÓN SCE	LOCALIZACIÓN RECEPTORES CB ₁
Actividad Motora	Estimulación del movimiento a dosis bajas, inhibición a dosis altas	Ganglios basales, cerebelo, sustancia negra
Nocicepción	Analgesia espinal y supraespinal	Áreas espinales y supraespinales implicadas en la nocicepción
Memoria y Aprendizaje	Modulación de la extinción de la memoria. Acciones sobre LTP y LTD	Hipocampo
Emoción y motivación	Alteraciones en motivación, emotividad, ansiedad y sistema de recompensa	Corteza cerebral, sistema límbico
Regulación neuroendocrina	Cambios en la liberación de hormonas adenohipofisiarias	Hipotálamo mediobasal
Emesis	Control de la náusea y el vómito	Área postrema
Control de la ingesta y apetito	Regulación del apetito y del balance energético	Núcleos hipotalámicos y límbicos, así como mecanismos periféricos
Termorregulación	Regulación de la temperatura corporal	Núcleos hipotalámicos y mecanismos periféricos
Desarrollo cerebral	Participación en el desarrollo como moduladores epigenéticos	Diversas áreas del SN en desarrollo
Neuroprotección	Regulación supervivencia celular	Neuronas y células de glía de diversas áreas del SN

Dado que el objetivo de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de patologías que afectan preferentemente al control de la actividad y de la coordinación motora, y que se producen a través de procesos de degeneración de estructuras específicas del SNC, a partir de ahora esta Introducción se centrará en revisar la relación de los cannabinoides en el control motor así como con los procesos de supervivencia neuronal.

3.7.1. Cannabinoides y control motor

Una de las acciones fisiológicas del sistema cannabinoide endógeno es el control de la actividad motora, especialmente los movimientos automatizados que se controlan desde los ganglios basales, así como la coordinación motora que se regula desde el cerebelo. La implicación del sistema cannabinoide endógeno en la regulación de la actividad motora se basa en tres líneas de evidencia:

- i. Se ha demostrado que los agonistas cannabinoides, sobre todo los agonistas CB₁, tienen potentes efectos sobre la actividad motora (Fernández-Ruiz y González, 2005).
- ii. Se ha descrito que los principales elementos del sistema cannabinoide endógeno están presentes a niveles elevados en las áreas cerebrales relacionadas con el control de la actividad motora (corteza cerebral, ganglios basales, cerebelo, tronco encefálico y medula espinal) (Cuadro 3). Cabe destacar que el receptor CB₁ es especialmente abundante en los ganglios basales y en el cerebelo.
- iii. También se ha demostrado que diferentes elementos del sistema cannabinoide endógeno están alterados en el cerebro de pacientes afectados por varios tipos de trastornos motores, así como en modelos experimentales de estas patologías (por ejemplo la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, distonía o disquinesia) (Fernández-Ruiz, 2009)

Los principales efectos de los agonistas cannabinoides sobre la actividad motora son hipoactividad, catalepsia y ataxia (Sañudo-Peña et al., 2000). No obstante, su efecto más bien parece ser bifásico, ya que, a dosis bajas de estos compuestos tienen un efecto estimulador sobre la actividad locomotora, mientras que a dosis altas producen una inhibición de la misma (Sañudo-Peña et al., 2000).

Estos efectos motores de los agonistas cannabinoides han demostrado ser el resultado de la capacidad de estas sustancias, y de las dianas a través de las que actúan, de interferir directa o indirectamente en la actividad de los principales neurotransmisores implicados en los circuitos cerebrales que regulan la actividad motora. Por ejemplo, en los ganglios basales, los endocannabinoides y sus receptores interaccionan con el glutamato y con el GABA de forma directa, y con dopamina de forma indirecta, con el resultado final de producir efectos hipoquinéticos y depresores cuando el tono endocannabinoide está elevado, y lo contrario cuando la actividad endocannabinoide se inhibe (Cadogan et al., 1997; Fernández-Ruiz y González, 2005; Fernández-Ruiz et al., 2002; Romero et al., 1995).

Cuadro 3. CONTROL Y COORDINACIÓN DEL MOVIMIENTO

(para ampliar ver libro *Human Motor Control* (Rosenbaum, 2014))

El control del movimiento es el resultado de la actividad coordinada de varias estructuras del SNC: áreas motoras corticales, tronco encefálico, ganglios basales, cerebelo y médula espinal (Rosenbaum, 2014).

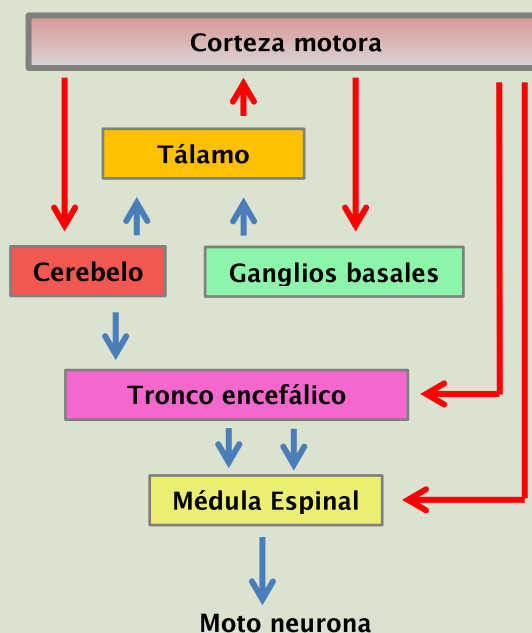
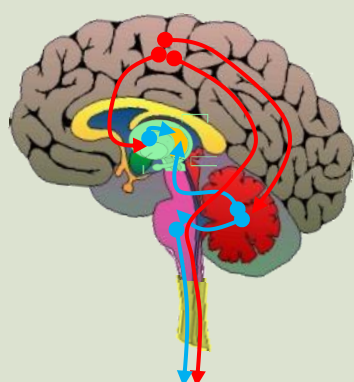
La **corteza motora** es la estructura cerebral responsable de los procesos de planificación, control y ejecución de las funciones motoras voluntarias. El **tronco encefálico** controla las funciones involuntarias como ciertos movimientos oculares, la audición, el habla, la masticación y la deglución.

Los **ganglios basales** y el **cerebelo** no están implicadas directamente en la producción del movimiento, pero ejercen un papel fundamental en la regulación y modulación de las órdenes de la corteza motora y del tronco encefálico. Los **ganglios basales** reciben aferencias y envían sus eferencias a la corteza cerebral. Participan en el control del movimiento voluntario al planificar, desencadenar y organizar los ajustes posturales y los automatismos asociados a los movimientos. Las enfermedades que afectan a los ganglios basales provocan movimientos anormales involuntarios (disquinesia), trastornos de la postura y alteraciones del movimiento como la bradiquinesia (lentitud en los movimientos voluntarios e involuntarios, dificultad para comenzar y terminar el movimiento).

El **cerebelo** realiza un control fino y coordinado de los movimientos, comparando las entradas sensoriales con las órdenes motoras descendentes. El cerebelo es también la parte del sistema nervioso que se encarga del aprendizaje motor. Los síntomas más característicos de la degeneración cerebelosa son una marcha tambaleante e inestable. Otros síntomas pueden incluir movimientos lentos y espasmódicos de las extremidades.

Todas estas señales de control convergen sobre la médula espinal y tronco cerebral. Estas estructuras son fundamentales para las acciones reflejas y punto final de control para los movimientos.

La **médula espinal** alberga las neuronas motoras, que son las encargadas de innervar y activar los músculos esqueléticos encargados de ejecutar el movimiento de las extremidades y el tronco. Lesiones a este nivel pueden provocar una pérdida de sensibilidad y/o de movilidad (Rosenbaum, 2014).



→ vía excitatoria
→ vía inhibitoria

En la otra estructura cerebral implicada en el control del movimiento, el cerebelo, los cannabinoides, a través de la activación del receptor CB_1 , producen cambios en las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas de las células de Purkinje. La modulación de estas sinapsis produce alteraciones en el procesamiento de la información que llega al cerebelo dando lugar a problemas en la coordinación y ejecución de movimientos precisos. Esto está en concordancia con la ataxia e incoordinación motora producida por los cannabinoides (DeSanty y Dar, 2001; Patel y Hillard, 2001).

3.7.2. Cannabinoides y regulación de la supervivencia neuronal

Se sabe que ante una situación patológica del sistema nervioso existe una respuesta endógena que tiene como objetivo preservar la estructura, función y viabilidad de las neuronas. Esta respuesta neuroprotectora consiste en la inducción de una serie de procesos que actúan de forma conjunta para incrementar el potencial de supervivencia de las células nerviosas y promover la recuperación funcional. El sistema cannabinoide endógeno es capaz de actuar de forma directa en vías de proliferación, diferenciación y homeostasis celular lo que sugiere un importante papel de este sistema de señalización en la regulación de los mecanismos de supervivencia celular (Fagan y Campbell, 2014; Gowran et al., 2011). Se ha visto cómo en diversas situaciones patológicas existe una respuesta de este sistema de señalización que se refleja en un incremento en los niveles de endocannabinoides e inducción de sus receptores, sobre todo del receptor CB_2 (Benito et al., 2008; Hansen et al., 2002; Massi et al., 2008; Mechoulam et al., 2002). Además, se ha visto cómo la activación de estos receptores se asocia con una activación de las vías de señalización encargadas de reparar el daño celular, atribuyéndose por tanto a los agonistas cannabinoides un efecto neuroprotector (van der Stelt y Di Marzo, 2005). Este papel neuroprotector del sistema endocannabinoide es en realidad un papel dual ya que, junto a la capacidad de preservar las neuronas y las células gliales frente a estímulos citotóxicos, el sistema cannabinoide también es capaz de provocar la apoptosis de células transformadas como son las células tumorales (glioma u otros tumores cerebrales) (Velasco et al., 2007), lo que también se asocia con la función de este sistema de señalización en la regulación de la supervivencia celular.

En este contexto, diversos estudios han demostrado que la activación de los receptores CB_1 hacen a las neuronas menos vulnerables a diferentes tipos de estímulos citotóxicos, principalmente excitotoxicidad pero también estrés oxidativo e inflamación (Marsicano et al., 2002; Walter y Stella, 2004; Zoppi et al., 2011). Por otro lado, la activación de los receptores CB_2 localizados en células gliales se ha visto que mejora la homeostasis y la supervivencia neuronal, bien a través de reducir los estímulos citotóxicos que las células de microglía reactiva ejercen sobre las neuronas, bien a través de incrementar el apoyo trófico que ejercen los astrocitos, o bien a través de la combinación de ambos efectos (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2008). Es importante destacar que, además de los efectos neuroprotectores mediados por los receptores cannabinoides CB_1 y CB_2 , existen compuestos cannabinoides con una afinidad muy baja por estos receptores pero que también presentan capacidad neuroprotectora, por ejemplo por sus propiedades antioxidantes, como es el caso del CBD (Fernández-Ruiz et al., 2013). Este tipo de compuestos como el CBD, pero también el dextranabinol (HU-211) y algunas *N*-aciletanolaminas como la PEA y la OEA, pueden actuar a través de dianas que no pertenecerían al sistema endocannabinoide, por

ejemplo, los receptores HT1A, el transportador de adenosina, los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA, del inglés *N-methyl-D-aspartate receptor*) y, sobretodo, los receptores nucleares PPAR (Fernández-Ruiz et al., 2013; Pandolfo et al., 2011; Sánchez-Blázquez et al., 2014; Sun y Bennett, 2007). Esto significa que los mecanismos moleculares que están implicados en las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides son muy diversos y, frecuentemente, se complementan entre sí lo que, sin duda, representa su principal ventaja sobre otro tipo de moléculas neuroprotectoras (Figura 10).

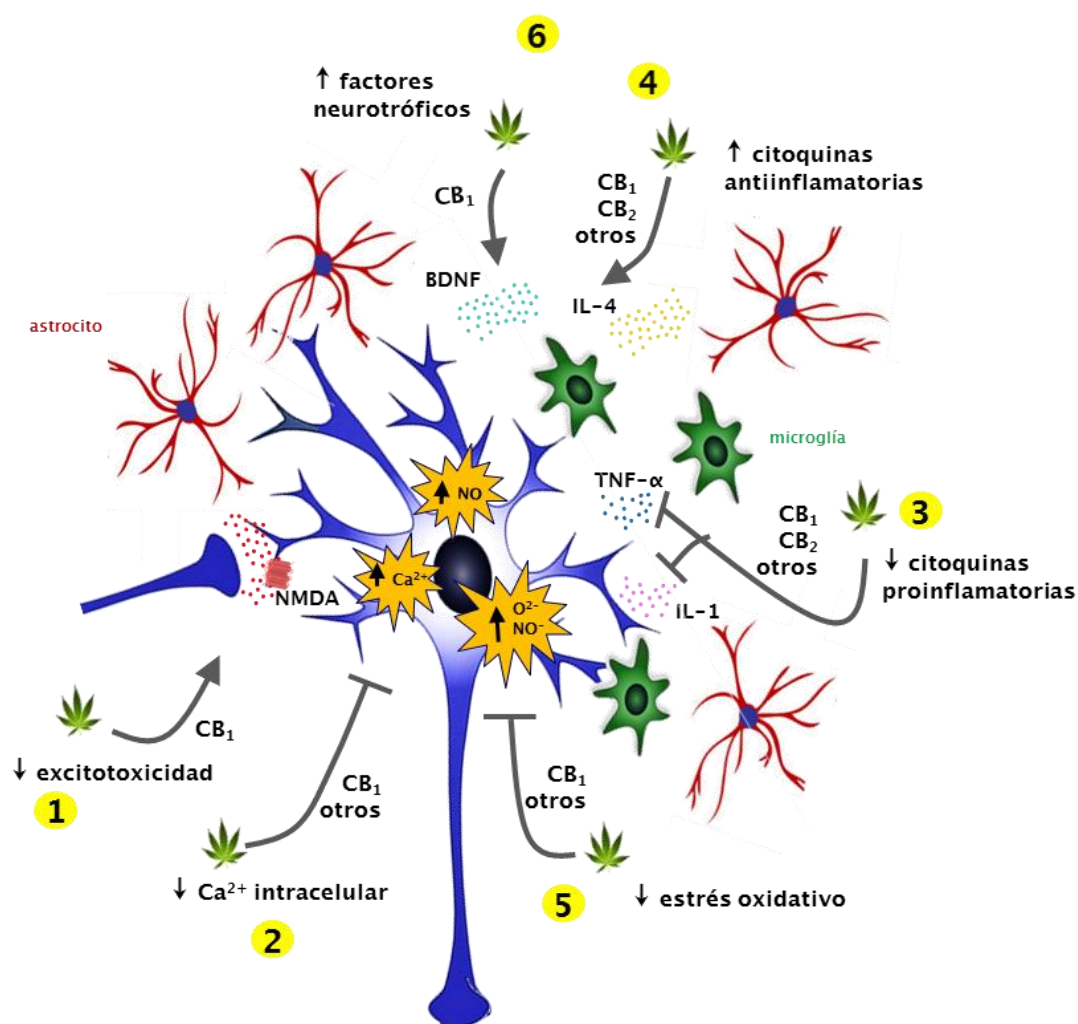


Figura 10. Principales mecanismos de neuroprotección de los cannabinoides. Ante una situación de daño las neuronas presentan una serie de mecanismos de neurodegeneración comunes como son el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , excitotoxicidad, inflamación o estrés oxidativo, entre otros. Los cannabinoides, a través de la activación de los receptores CB₁, CB₂ y mediante mecanismos independientes de estos receptores activan una serie de vías de señalización encargadas de reparar el daño celular. Algunos de estos mecanismos de neuroprotección son: A, disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular; B, reducción de los fenómenos de excitotoxicidad; C, reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias; D, aumento de la producción de citoquinas antiinflamatorias, E, disminución de la concentración de radicales libres; F, producción de factores tróficos.

Estas propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides resultan interesantes para el tratamiento de las enfermedades neurológicas en las que el daño neuronal es consecuencia de la acumulación de diversos mecanismos. En este sentido, numerosos estudios a nivel preclínico y clínico han descrito a los agonistas de los receptores cannabinoides CB₁ y/o CB₂, así como cannabinoides con mecanismos de acción independientes de estos receptores, como neuroprotectores en modelos animales de daño agudo como la isquemia y el trauma cerebral y también en enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras (Fernández-Ruiz et al., 2010, 2014; Giacoppo et al., 2014). En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran de forma resumida algunos de los mecanismos de neuroprotección inducidos por los cannabinoides en estas enfermedades.

Tabla 4. Mecanismos de neuroprotección inducidos por los agonistas cannabinoides en algunas de las enfermedades neurodegenerativas con mayor incidencia en la población. Tabla adaptada de (Giacoppo et al., 2014).

Enfermedad	Efectos neuroprotectores de los cannabinoides
Parkinson	Actividad antioxidante (modulación Nrf-2)
	Disminuyen la actividad de NFκβ
	Disminuyen citoquinas proinflamatorias (TNFα, IL-1β) y ROS
	Aumentan factores tróficos y citoquinas anti-inflamatorias (IL-10)
Huntington	Reducen la microglía reactiva y los procesos de astrogliosis
	Disminuyen el estrés oxidativo
	Contrarrestan la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias
	Reducen la agregación de la huntingtina mutada
Alzheimer	Atenúan la toxicidad asociada a los agregados de huntingtina
	Disminuyen la producción del péptido Aβ
	Reducen la producción de ROS y la peroxidación lipídica
	Modulan la expresión de iNOS
	Disminuyen la MAP quinasa p38, NFκβ y la caspasa-3
Esclerosis múltiple	Modulan la función celular de la microglía y la expresión de citoquinas (TNFα, IL-1β)
	Reducen la apoptosis
	Previenen excitotoxicidad (reducción de la liberación y señalización de glutamato)
	Promueven la supervivencia de oligodendrocitos
	Reducen la inflamación, probablemente disminuyendo la liberación de TNFα e IL-1β
Esclerosis lateral amiotrófica	Reducen activación de la microglía e infiltración de células T
	Reducen peroxidación
	Reducen excitotoxicidad (reducción de los niveles de glutamato)
	Reducen daño oxidativo (citoquinas, NO y ROS)

A continuación se presentan los principales mecanismos implicados en estos efectos neuroprotectores:

3.7.2.1. Efectos antiexcitotóxicos

En los procesos neurodegenerativos agudos y crónicos se produce una liberación masiva de aminoácidos excitatorios, como el glutamato, que al interactuar con diferentes receptores celulares, como el receptor NMDA, produce un aumento rápido y masivo de calcio en las neuronas, lo que ocasiona una sobreactivación de mecanismos celulares dependientes de calcio que resultan ser destructivos para la célula (ver en la siguiente sección) (Dong et al., 2009; Sattler y Tymianski, 2000). En este contexto, los cannabinoides tienen la capacidad de activar los receptores CB₁ presinápticos, lo cual produce una disminución de la liberación de glutamato y por lo tanto disminución del daño neuronal (Gilbert et al., 2007; Hampson y Grimaldi, 2001; Kim et al., 2006; Skaper et al., 1996; Zoppi et al., 2011) (**Error! No se encuentra el origen de la referencia. A**).

3.7.2.2. Modulación de la homeostasis del calcio

Un exceso de iones calcio en el interior celular produce la activación de distintos tipos de enzimas degradativas, proteínas quinasas, así como de varias vías de generación de radicales libres. Además, el calcio intracelular también puede penetrar en el núcleo neuronal. El aumento intranuclear del calcio es crítico para la transcripción genética, pues activa genes proapoptóticos y una cascada de fenómenos bioquímicos y moleculares que culminan con el aumento de las caspasas y muerte neuronal por apoptosis (Sattler y Tymianski, 2000). La activación del receptor CB₁ por los cannabinoides inhibe la liberación de calcio intracelular, evitando así la activación de las cascadas intracelulares dependientes de calcio con capacidad de producir daño neuronal (van der Stelt y Di Marzo, 2005; Zhuang et al., 2005). Recientes estudios sugieren que la activación de los canales TRPV1 también puede contribuir a reducir los niveles de calcio intracelular (Iannotti et al., 2014) (Tabla 4 B).

3.7.2.3. Efecto antiinflamatorio

Cuando se desencadenan procesos de daño en el sistema nervioso se produce la liberación de moléculas que favorecen la muerte neuronal. Un ejemplo de estos procesos incluye la síntesis masiva de NO, y la producción por parte de las células gliales de citoquinas y moléculas mediadoras de la respuesta neuroinflamatoria (Allan y Rothwell, 2001; Drechsel et al., 2012). Algunos agonistas cannabinoides se comportan como moléculas antiinflamatorias a través de la modulación de la respuesta inmune y de la liberación de estos mediadores proinflamatorios. Este efecto antiinflamatorio esta mediado principalmente por la activación de los receptores CB₂, aunque también CB₁, e incluso a través de mecanismos no mediados por dichos receptores (por ejemplo, mediados por receptores PPAR- γ (Correa et al., 2005, 2007; Klein, 2005; Molina-Holgado et al., 1997; Stella, 2004). La activación de estos mecanismos produce la inhibición de la liberación y la síntesis de citoquinas (especialmente IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor alpha*) (Klein, 2005). Los cannabinoides son por tanto capaces de reducir los acontecimientos inflamatorios que, frecuentemente, acompañan a distintas enfermedades

neurodegenerativas en las que se ha visto que hay activación de células gliales en zonas de lesión (De Filippis et al., 2009) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** C, D).

3.7.2.4.Efecto antioxidante

Uno de los procesos fundamentales en la degeneración neuronal es el estrés oxidativo. La condición de estrés oxidativo se da cuando tras una elevación de los niveles de calcio intracelular se activan una serie de enzimas generadoras de factores neurotóxicos, como la óxido nítrico sintasa (NOS), potenciándose la producción de radicales libres de nitrógeno y de oxígeno. También por el daño de la mitocondria que es la principal fuente de producción de radicales libres. La presencia de especies reactivas produce daño neuronal por desnaturalización de proteínas, peroxidación de los lípidos de la membrana y rupturas del ADN, procesos que conllevan en último término a la muerte celular (Moncada y Bolaños, 2006). Los cannabinoides pueden ser neuroprotectores por su capacidad de disminuir la concentración de radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Este efecto antioxidante de los cannabinoides es doble, y en ambos casos parece ser mediado por un mecanismo independiente de los receptores cannabinoides conocidos. Por un lado, algunos cannabinoides pueden actuar como lavadoras de radicales libres gracias a la presencia de un anillo fenólico en su estructura química, lo que permite a estos compuestos reaccionar con las moléculas reactivas neutralizando su efecto tóxico (García-Arencibia et al., 2007; Hampson et al., 1998; Marsicano et al., 2002) (Tabla 4 E). Por otro lado, algunos cannabinoides podrían interaccionar (se desconoce a qué nivel) con las vías intracelulares implicadas en la regulación de la respuesta antioxidante, principalmente la señalización por la vía del factor de transcripción Nrf-2 (del inglés *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) (Fernández-Ruiz et al., 2011, 2013). Es posible que esta segunda opción implique la participación de los receptores nucleares PPAR.

3.7.2.5.Regulación de factores neurotróficos y vías de señalización

Diversos estudios han mostrado que los cannabinoides son capaces de regular la producción de factores neurotróficos, que constituyen moléculas esenciales para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las neuronas maduras en el SNC y periférico (Sofroniew et al., 2001). En este sentido, se ha demostrado que el Δ^9 -THC, administrado de forma crónica, puede aumentar los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro en diversas zonas cerebrales (Butovsky et al., 2005). El BDNF es un regulador clave en los mecanismos de neuroprotección dependientes del receptor CB₁ (Khaspekov et al., 2004) (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**F). Diferentes estudios demuestran, además, que los cannabinoides, a través de los receptores CB₁ y CB₂, favorecen la supervivencia neuronal mediante la activación de diferentes vías de señalización como las quinasas de la vía MAPK (Derkinderen et al., 1996), PKA (Kim et al., 2005) y a través de la proteína Akt (Molina-Holgado et al., 2002). La activación de la vía de Akt es el principal mecanismo por el que las neurotrofinas promueven sus efectos dotando a las células de una señal de supervivencia que les permite hacer frente a diferentes estímulos apoptóticos. Por tanto, los efectos anti-apoptóticos de los cannabinoides a través de la proteína Akt pueden ser debidos a tres mecanismos distintos: (i) Regulación directa de la vía apoptótica, (ii) control

transcripcional de la supervivencia celular y (iii) regulación del metabolismo celular (Song et al., 2005).

Finalmente, en relación a lo comentado previamente sobre el efecto dual de los cannabinoides en la supervivencia neuronal, estos compuestos pueden aumentar la concentración de ceramida en las células, lo que dispara toda una cascada de eventos que incluyen la activación de la ruta de estrés del retículo endoplásmico y la inducción de genes implicados en los procesos de muerte celular como por ejemplo el coactivador transcripcional p8 o la pseudoquinasa TRB3 (Galve-Roperh et al., 2008). Este efecto proapoptótico no se opone al potencial neuroprotector de los cannabinoides, ya que es bastante selectivo frente a células tumorales de origen glial (Sánchez et al., 1998) y neuronal (Maccarrone et al., 2000). Los cannabinoides mediante este mecanismo ayudan a acelerar la muerte de las células irreversiblemente dañadas, limitando en el tiempo su posible efecto lesivo sobre otras células supervivientes (Fowler, 2003).

3.7.2.6.Efectos sobre la autofagia

Los cannabinoides podrían ser neuroprotectores o también inductores de apoptosis mediante la activación de los procesos de autofagia. La autofagia es un mecanismo celular implicado en la degradación de macromoléculas o de orgánulos enteros. Este proceso interviene en numerosos procesos fisiológicos así como en diferentes condiciones patológicas. Se ha descrito que la activación de la autofagia tiene un papel esencial en la eliminación de los agregados de proteínas característicos de las enfermedades neurodegenerativas, como son la SCA1 (Iwata et al., 2005) o la enfermedad de Huntington (Safren et al., 2014). Ciertos agonistas cannabinoides, como por ejemplo el Δ^9 -THC, han demostrado ser capaces de estimular la autofagia celular en células de glioma humano. Un mecanismo mediado por el receptor CB₁ y dependiente de la inhibición de la vía Akt/mTORC1 (del inglés *mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) (Salazar et al., 2009). En base a estos datos, es posible que los cannabinoides tengan también un papel en la protección frente a la autofagia que se activa en las enfermedades neurodegenerativas como consecuencia de la presencia de agregados proteicos, pero el tema es controvertido por diferentes razones:

- i. Si la autofagia es inducida por agonistas cannabinoides para provocar la apoptosis de células tumorales, entonces es posible que el efecto contrario, prevención de la autofagia, pueda ser provocado por la inhibición de la actividad endocannabinoide (por ejemplo con el uso de antagonistas CB₁) lo cual no está demostrado.
- ii. Existen discrepancias en cuanto al papel beneficioso o citotóxico de la autofagia en enfermedades neurodegenerativas (Son et al., 2012), ya que para algunos investigadores la inducción de autofagia es una forma de defensa frente a la toxicidad de los agregados proteicos (en este caso, los agonistas CB₁ induciendo autofagia serían neuroprotectores), pero otros investigadores identifican la inducción de autofagia como un mecanismo que contribuye al daño (en este caso, se necesitarían antagonistas CB₁ para preservar la supervivencia de las neuronas).

3.7.2.7. Control sobre la temperatura corporal

Otro de los mecanismos neuroprotectores atribuidos a los cannabinoides es la capacidad de reducir la temperatura corporal, dicho efecto parece estar mediado por los receptores cannabinoides CB₁ (Leker et al., 2003). La hipotermia se considera uno de los mecanismos neuroprotectores naturales, debido a que reduce la tasa metabólica y la demanda de oxígeno, reduce la corriente de calcio al interior celular, disminuye el estrés oxidativo, entre otros. Este efecto neuroprotector de los cannabinoides puede ser de mayor interés en los procesos degenerativos agudos, como la isquemia o el trauma cerebral (Leker et al., 2003).

3.7.2.8. Efectos vasodilatadores

Una de las causas más comunes de los episodios agudos de neurodegeneración es el daño cerebrovascular (infarto cerebral o ictus). Este ocurre cuando un vaso sanguíneo se rompe o es taponado. Debido a esta ruptura o bloqueo, las células nerviosas no pueden recibir nutrientes y oxígeno, por lo que se afecta su funcionamiento y mueren. En este sentido, los cannabinoides se han investigado por las múltiples propiedades neuroprotectoras descritas anteriormente, pero también por su capacidad de inducir vasodilatación. Los cannabinoides son vasodilatadores por varios mecanismos mediados por los receptores CB₁, CB₂ y TRPV1 y posiblemente sobre otros receptores aún no definidos (Golech et al., 2004; López-Miranda et al., 2008; Stefano, 2000; Zygmunt et al., 1999). Entre los mecanismos vasodilatadores regulados por los cannabinoides se incluyen la liberación de NO, intermedios del metabolismo del ácido araquidónico como prostamidas, y péptidos vasoactivos, entre otros.

3.7.2.9. Neurogénesis

Además de su papel, ejercido a través de múltiples mecanismos descritos en los anteriores apartados, las cannabinoides también pueden resultar beneficiosos frente al daño degenerativo por su capacidad para inducir neurogénesis en cerebro adulto y, por tanto, de generar nuevas neuronas pero también células gliales, capaces de remplazar las células dañadas. Se ha visto que los cannabinoides, a través de los receptores CB₁ y CB₂, son capaces de regular los mecanismos de proliferación y diferenciación de precursores neurales, así como de favorecer su migración a los sitios lesionados (Aguado et al., 2007; Rubio-Araiz et al., 2008). Unas propiedades que están siendo investigadas para desarrollar terapias reparadoras basadas en la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide.

4. POSIBLES APLICACIONES TERAPEUTICAS DE LOS CANNABINOIDES EN LAS ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS

Los pacientes enfermos de SCA presentan problemas relacionados con realización de movimientos coordinados y precisos, debido principalmente a la degeneración del cerebelo y sus conexiones aferentes y eferentes. Al igual que ocurre con otras patologías neurodegenerativas, la eficacia de los tratamientos farmacológicos ensayados en esta enfermedad es aún muy limitada. Por ello, se necesita buscar nuevos fármacos que puedan aliviar los principales síntomas de la enfermedad, y sobre todo, que puedan retrasar o prevenir la progresión de la degeneración cerebelosa. Los cannabinoides podrían ser de interés a nivel sintomático en las SCAs por su capacidad de regular, a través del receptor CB₁, la transmisión sináptica de los circuitos neuronales implicados en la enfermedad. Por otro lado, el tratamiento con cannabinoides podría ser útil para frenar o enlentecer la progresión de la muerte neuronal característica de las SCAs, gracias a las propiedades neuroprotectoras y neuroreparadoras de estos compuestos que implican a los receptores CB₁ y CB₂ pero también a otras dianas farmacológicas (Fernández-Ruiz et al., 2010).

4.1. El sistema endocannabinoide en el circuito neuronal afectado en las SCAs

La localización de los receptores y enzimas implicadas en el metabolismo de los endocannabinoides en la vía integradora de la información que llega al cerebelo corrobora la implicación de este sistema de señalización en la modulación de la plasticidad sináptica en el control y aprendizaje motor (Figura 11). Estos datos establecen la base para el uso de este sistema de comunicación celular como una potencial diana para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones en estas funciones, como son las SCAs (Suárez et al., 2008).

4.1.1. Localización del receptor CB₁

El cerebelo, principal región afectada en las SCAs, es una de las estructuras cerebrales donde hay mayor expresión del receptor CB₁ en el SNC (Herkenham et al., 1991b; Tsou et al., 1998b). Mediante técnicas de inmunohistoquímica y autorradiografía se ha visto que este receptor está localizado en la capa molecular de la corteza cerebelosa, en particular el receptor CB₁ se expresa en la mayoría de los axones que contactan con las dendritas de las células de Purkinje: los axones de las células granulares (fibras paralelas), las fibras aferentes que proceden del núcleo de la oliva inferior (fibras trepadoras) y los axones de las células estrelladas (Ashton et al., 2004; Egertová y Elphick, 2000; Herkenham et al., 1991b; Moldrich y Wenger, 2000; Pettit et al., 1998; Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998b). En la capa de células de Purkinje el receptor CB₁ se

localiza en los terminales de las células en cesto que forman unas estructuras características en torno al segmento inicial del axón de las células de Purkinje, conocidas como formaciones tipo pincel (Ashton et al., 2004; Egertová et al., 1998; Kawamura et al., 2006; Suárez et al., 2008). En los núcleos profundos del cerebelo se ha observado una menor expresión del receptor CB_1 que se localiza sobre todo en los terminales de las fibras trepadoras procedentes de la oliva inferior (Suárez et al., 2008). Por otro lado, varios estudios han descrito la presencia del receptor CB_1 en fibras y en las neuronas de los dos principales núcleos aferentes a la corteza cerebelosa (oliva inferior y núcleo pontino) (Cristino et al., 2006; Matsuda et al., 1993; Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998b).

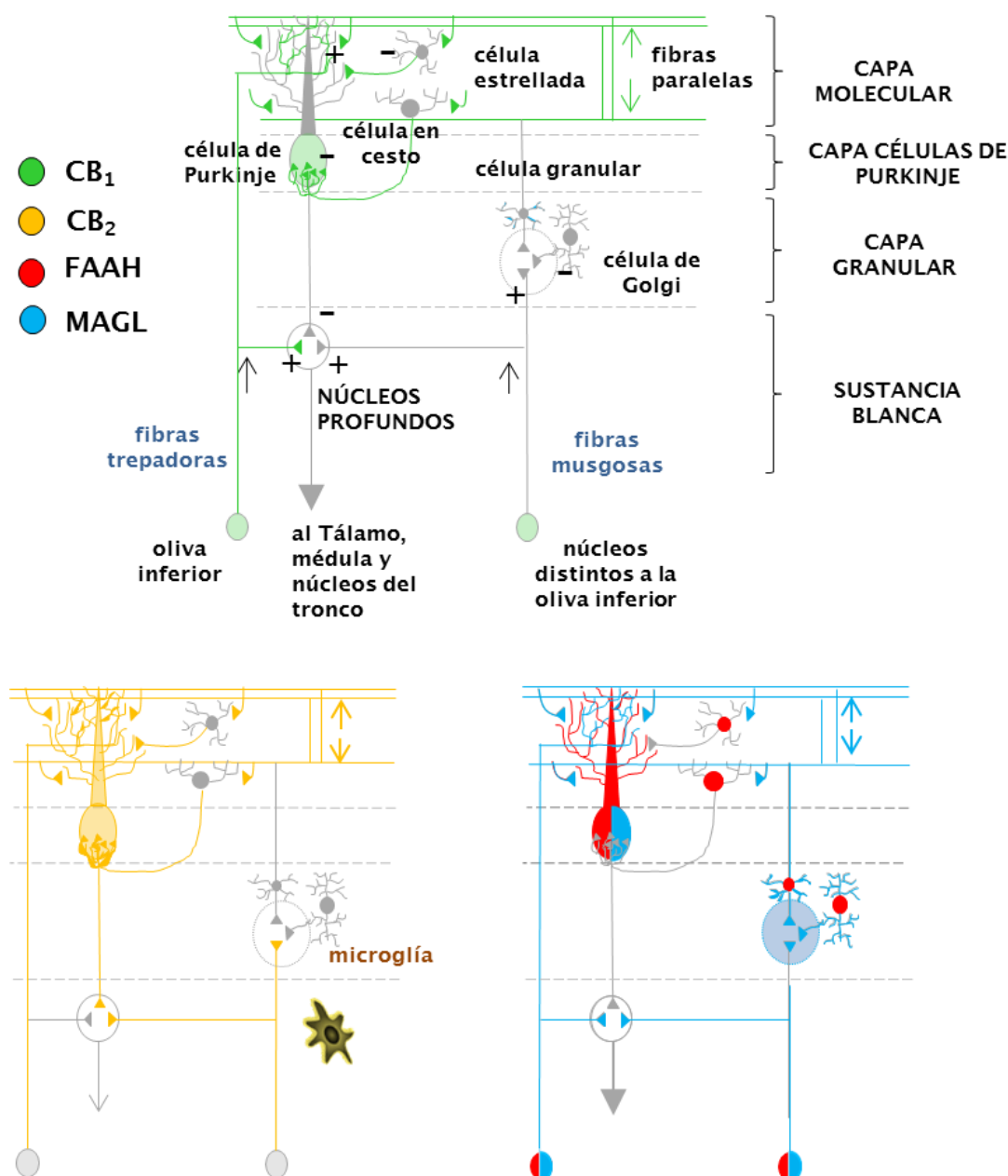


Figura 11. Localización de los principales elementos del sistema cannabinoide endógeno en los circuitos neuronales afectados en las SCAs. Los distintos elementos del SCE, en particular los receptores CB_1 y CB_2 y las enzimas implicadas en el metabolismo de endocannabinoides se expresan abundantemente en las regiones cerebrales principalmente afectadas en las SCAs, como el cerebelo (corteza cerebelosa y núcleos profundos) y los núcleos del tronco encefálico (oliva inferior).

4.1.2. Localización del receptor CB₂

Mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas se ha podido localizar la presencia del receptor CB₂ en la corteza cerebelosa (capa granular y capa molecular) (Suárez et al., 2008). En la capa granular, el marcaje se localiza en axones aferentes procedentes de distintas áreas cerebrales (fibras musgosas). En la capa molecular, el receptor CB₂ parece estar localizado en las fibras paralelas (Suárez et al., 2008). Mediante este tipo de técnicas de inmunohistoquímica también se ha identificado al receptor CB₂ en el soma y árbol dendrítico (capa molecular) de las células de Purkinje (Ashton et al., 2006; Gong et al., 2006). Sin embargo, otros autores sugieren que el marcaje de CB₂ en las células de Purkinje se localizaría en los terminales de las células en cesto que sinaptan con estas células (formaciones tipo pincel) (Suárez et al., 2008). En la sustancia blanca, se ha descrito expresión del receptor CB₂ en fibras (Ashton et al., 2006) y en células microgliales perivasculares (Núñez et al., 2004).

El receptor CB₂ también se localiza en los núcleos profundos del cerebelo, en concreto en los terminales de las fibras musgosas procedentes de otras áreas cerebrales como el núcleo pontino, los núcleos vestibulares o la médula espinal. También se ha propuesto que el marcaje del receptor CB₂ en estos núcleos podría estar localizado en los terminales de los axones procedentes de las células de Purkinje (Suárez et al., 2008).

En cuanto a los otros núcleos cerebrales afectados en las SCAs, se ha visto que el receptor CB₂ está presente tanto en la oliva inferior como en el núcleo pontino. En ambos casos se ha propuesto que la localización de este receptor es en fibras que corresponden a colaterales de las fibras musgosas procedentes de la médula espinal o incluso en células gliales (Gong et al., 2006; Suárez et al., 2008).

4.1.3. Localización de las enzimas del metabolismo de endocannabinoides

Las enzimas de síntesis de endocannabinoides, la NAPE-PLD y las isoformas α y β de la DAGL, así como las enzimas de degradación, FAAH y MAGL, se expresan abundantemente en el cerebelo (Suárez et al., 2008). Las enzimas responsables de la biosíntesis de endocannabinoides (NAPE-PLD y DAGL) se expresan de manera postsináptica en el árbol dendrítico y cuerpo celular de las células de Purkinje, así como en la capa granular y en los núcleos profundos del cerebelo. También se ha descrito la presencia de estas enzimas en los cuerpos celulares de las neuronas de los núcleos del tronco encefálico como la oliva inferior (Bisogno et al., 2003; Suárez et al., 2008).

En el caso de las enzimas de degradación de endocannabinoides, FAAH y MAGL, se observa una localización complementaria para ambas proteínas en los circuitos del cerebelo. Así, la enzima FAAH presenta una localización postsináptica y se ha descrito principalmente en somas de neuronas: células de Purkinje (también en sus dendritas), células granulares y en las neuronas de los núcleos profundos del cerebelo (Egertová et al., 1998; Gulyas et al., 2004; Romero et al., 2002b; Suárez et al., 2008). La enzima MAGL, en cambio, presenta una localización presináptica (Dinh et al., 2002). Esta enzima se localiza en los terminales axónicos de las fibras paralelas y las fibras trepadoras procedentes de la oliva inferior que sinaptan en la capa molecular con las dendritas de las células de Purkinje. La enzima MAGL se expresa moderadamente en los cuerpos celulares de las células de Purkinje, no así su árbol dendrítico (Suárez et al., 2008). En la capa

granular se observa expresión de la enzima MAGL en lo que parecen ser los glomérulos cerebelosos (condensaciones de las dendritas de las células granulares y los terminales de las fibras musgosas). En los núcleos profundos del cerebelo, se observa expresión de la enzima MAGL en las fibras musgosas y en los cuerpos celulares de las neuronas. Por otro lado, también se ha descrito la expresión de las dos enzimas de degradación de endocannabinoides en las neuronas tanto de la oliva inferior como del núcleo pontino (Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998a).

4.1.4. Endocannabinoides

Tanto la AEA como el 2-AG están presentes en el cerebelo aunque sus concentraciones se encuentran entre las más bajas del estudio regional llevado a cabo por Bisogno et al. (1999) cuando se compara con otras estructuras cerebrales, a pesar de que el cerebelo es de las regiones cerebrales donde la presencia de receptores CB₁, por ejemplo, es más elevada (Bisogno et al., 1999). Experimentos *in vitro* apoyan la idea de que el 2-AG es el principal endocannabinoide en la corteza cerebelosa (Blankman y Cravatt, 2013). La localización de la enzima de síntesis del 2-AG, la enzima DAGL, en las células de Purkinje (Bisogno et al., 2003), y la de la principal enzima de degradación del 2-AG, la enzima MAGL, en localizaciones presinápticas (Gulyas et al., 2004), es consistente con la idea de que el 2-AG regula las sinapsis entre las dendritas de las células de Purkinje y los elementos presinápticos que llegan ellas. La expresión de FAAH en las dendritas de las células de Purkinje (Gulyas et al., 2004) sugiere que la AEA, además del 2-AG, podría también estar implicada en la fisiología del cerebelo. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio fisiológico ha proporcionado evidencia de un papel de la AEA en el cerebelo.

4.1.5. Papel del sistema cannabinoide endógeno en la neurotransmisión en el cerebelo

Debido a los altos niveles que el receptor CB₁ tiene en los terminales presinápticos de las neuronas del cerebelo es imaginable que este receptor activado por los diferentes endocannabinoides, a pesar de su discreta concentración, debe tener un importante papel regulador en la funcionalidad de los dos principales neurotransmisores de esta estructura, es decir, el GABA y el glutamato. Se sabe que la activación del receptor CB₁ suprime en el cerebelo la transmisión sináptica de un gran número de sinapsis. En concreto, se ha visto que la activación de los receptores CB₁ suprime la transmisión sináptica de tipo excitatorio (DSE) de las fibras paralelas y trepadoras con las células de Purkinje (Kawamura et al., 2006; Tanimura et al., 2009), perjudicando los fenómenos de LTD en dichas células (Carey et al., 2011; Lévénés et al., 1998). Además, se ha puesto de manifiesto que la activación de este receptor también está implicado en procesos de DSI mediante la inhibición de la liberación de GABA en la sinapsis entre las interneuronas y las células de Purkinje (Kreitzer y Regehr, 2001; Takahashi y Linden, 2000). Estos datos sugieren que los receptores CB₁ tienen un importante papel en la regulación de la plasticidad sináptica a nivel del cerebelo, modulando de forma retrógrada las sinapsis que establecen las células de Purkinje con las interneuronas inhibitorias y con las fibras paralelas y trepadoras excitatorias que llegan a ellas. El control de la coordinación motora en los circuitos cerebelosos parece depender, por tanto, del balance entre los sistemas excitatorios e inhibitorios.

Es importante destacar que las células de Purkinje representan la única vía eferente de la corteza cerebelosa. La mayor vía de inhibición sobre estas células es proporcionada por las células en cesto. La prominente expresión de los receptores CB₁ dentro de las formaciones tipo pincel (Egertová y Elphick, 2000; Tsou et al., 1998b) proporciona, por tanto, un importante sistema de modulación de la actividad del cerebelo.

4.2. Implicación del sistema cannabinoide endógeno en la disfunción motora

Al igual que se ha visto en otras enfermedades que originan alteraciones de la actividad motora, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, las disquinesias, etc, el sistema endocannabinoide podría tener una relación directa con las patologías que afectan también al cerebelo que, junto con los ganglios basales que son determinantes en la patologías citadas anteriormente, es otra de las estructuras cerebrales fundamentales en el control motor (Fernández-Ruiz et al., 2011).

No se conoce nada hasta el momento sobre la implicación del sistema cannabinoide endógeno (cambios en receptores, enzimas y ligandos que pudieran dar una idea de una posible desregulación de este sistema de señalización) en la patogénesis de ninguna de las enfermedades que afectan al cerebelo, entre ellas las SCAs. Tampoco en cuanto a la posibilidad de manipular farmacológicamente este sistema para obtener beneficios a nivel sintomático o a nivel de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, es de suponer que, en base a lo observado para otras enfermedades neurodegenerativas y debido a la elevada expresión del sistema cannabinoide endógeno en el cerebelo especialmente de los receptores, quizás, alguno de los síntomas observados en las SCAs pueda estar relacionado con alteraciones en la expresión de alguno de los elementos de este sistema de señalización en el circuito del cerebelo, así como que se puedan obtener beneficios de su manipulación farmacológica.

Se ha planteado la hipótesis de que los síntomas motores de la disfunción cerebelosa surgen cuando la salida excitadora de los núcleos profundos del cerebelo se ve reducida o interrumpida. Esta hipótesis se basa en datos previos que demuestran, por un lado, que lesiones a nivel de los núcleos profundos del cerebelo producen síntomas de disfunción cerebelosa (Modianos y Pfaff, 1976; Poirier et al., 1974), por otro, que la activación anormal de las células de Purkinje ocasiona la inhibición de los núcleos profundos y por tanto disfunción del cerebelo (O'Hearn y Molliver, 1997). Se ha postulado que la activación del receptor CB₁ a nivel del cerebelo, puede producir alteraciones motoras por un mecanismo similar. Es decir, los endocannabinoides, a través de los receptores CB₁ presentes en los terminales de las células en cesto, inhiben la liberación de GABA, produciendo un exceso de excitación de las células de Purkinje en respuesta a la excitación producida por las fibras trepadoras. El efecto final de este incremento en la excitación de las células de Purkinje es un exceso de inhibición de los núcleos profundos del cerebelo responsables, en último término, de las alteraciones de la coordinación del movimiento (Patel y Hillard, 2001). Esta hipótesis está de acuerdo con datos que demuestran que el Δ^9 -THC disminuye la actividad de las neuronas en los núcleos profundos del cerebelo en humanos (Bloom et al., 2000) e incrementa la actividad metabólica y el flujo sanguíneo en la corteza cerebelosa (Mathew et al., 1998; Volkow et al., 1991).

Sería interesante conocer los posibles cambios que se dan en el sistema cannabinoide endógeno durante el transcurso de la degeneración cerebelosa característica de las SCAs. La presencia de cambios en elementos del SEC en estas enfermedades supondría una potencial diana terapéutica en el tratamiento de las mismas, como ya se ha demostrado en otras patologías neurodegenerativas (Romero y Orgado, 2009; Scotter et al., 2010). En este sentido, un estudio realizado en el ratón mutante Lurcher (caracterizado por la degeneración de la corteza cerebelosa y de las proyecciones de la oliva) ha demostrado que el tratamiento con el agonista cannabinoide Δ^9 -THC puede reducir las alteraciones motoras asociadas a la disfunción cerebelosa. El mecanismo por el cual se produce este efecto no es conocido pero, es importante destacar, que este efecto sólo se observó a dosis bajas del cannabinoide (4mg/Kg), mientras que a dosis altas (8mg/Kg) las mejoras fueron menos pronunciadas, sugiriendo un efecto bifásico de los cannabinoides en la coordinación motora. Este efecto bifásico de los cannabinoides está en concordancia con datos previos sobre estos compuestos en la actividad locomotora (Sañudo-Peña et al., 2000).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, diversos factores parecen jugar un papel importante en la etiopatogenia de las SCAs. Se ha demostrado que estos trastornos neurológicos presentan un importante componente neurodegenerativo, que en muchos aspectos es común a otras enfermedades neurodegenerativas, y que está asociado a procesos de excitotoxicidad, estrés oxidativo y neuroinflamación que actúan de forma cooperativa dañando a las neuronas y produciendo la muerte celular (ver apartado 1.2.3 de la Introducción) (Carlson et al., 2009; Matilla-Dueñas et al., 2010, 2014). La activación de diferentes dianas en el sistema cannabinoide endógeno se ha visto que puede inhibir estos eventos y detener la progresión de la neurodegeneración (Gowran et al., 2011). Los cannabinoides podrían atenuar los fenómenos de excitotoxicidad, reducir el daño oxidativo y limitar los procesos de inflamación característicos de las SCAs. Además, también influyen en la proliferación, diferenciación celular y transmisión sináptica (ver apartado 2.6.2 de la Introducción). Dentro de estos posibles efectos, el receptor CB₁ parece que podría tener más importancia en procesos excitotóxicos, mientras que el receptor CB₂ estaría más relacionado con los procesos inflamatorios que tienen lugar (Gowran et al., 2011). Algunos cannabinoides también tienen propiedades antioxidantes que podrían frenar el daño oxidativo que también ocurre en estas enfermedades (Fernández-Ruiz et al., 2013).

En resumen, dada la complejidad de los mecanismos patogénicos que afectan a las SCAs, una buena estrategia terapéutica debe estar basada en moléculas, o combinaciones de moléculas, que puedan ser eficaces frente a varios de los procesos citotóxicos característicos (Matilla-Dueñas et al., 2010, 2014). En este sentido, los cannabinoides son una interesante familia a considerar ya que, por un lado, pueden combinar diferentes mecanismos de neuroprotección y por otro lado, tienen la capacidad de regular la transmisión sináptica de los circuitos neuronales implicados en la enfermedad, lo que podría servir para el tratamiento de síntomas específicos. Por ello, se propone que la manipulación farmacológica de diferentes elementos del sistema cannabinoide endógeno, siempre en función de cómo se altere en el transcurso de la enfermedad, podría servir en el tratamiento sintomático y neuroprotector de este conjunto de enfermedades. En esta tesis doctoral, nos planteamos estudiar en detalle la relación del sistema cannabinoide endógeno con la patogénesis de las SCAs, así como las oportunidades que este sistema puede tener para desarrollar una terapia específica.

II. OBJETIVOS

Como se ha comentado en la Introducción, las SCAs constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que cursan tanto con síntomas motores como con alteraciones psiquiátricas y cognitivas. Desgraciadamente, no se dispone de ningún tipo de remedio curativo para estas enfermedades, existiendo sólo algunas opciones terapéuticas dirigidas al alivio de los síntomas más incapacitantes, pero todas ellas muy limitadas en cuanto a eficacia. Por ello, es necesaria la identificación de los mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad así como el desarrollo de nuevas terapias. El estudio de los posibles efectos terapéuticos de los cannabinoides derivados de la modulación del sistema cannabinoide endógeno podría ser un nuevo y prometedor campo de investigación en plena expansión. En la presente Tesis Doctoral nos proponemos avanzar en el conocimiento del potencial efecto neuroprotector de los cannabinoides en las ataxias espinocerebelosas, especialmente en aquellas debidas a la repetición del triplete CAG en la región codificante de genes específicos. La hipótesis central de este trabajo pretende demostrar que el estudio del sistema cannabinoide endógeno y su posible disregulación en las SCAs proporciona elementos importantes para un mayor entendimiento de la progresión de estas enfermedades, así como para el diseño de posibles tratamientos farmacológicos asociados con esas alteraciones. Unos tratamientos que podrían ser dirigidos a aumentar las respuestas endógenas protectoras, pero también dirigidos a disminuir las respuestas endógenas patogénicas. En concreto, nos planteamos los siguientes objetivos en relación al estudio del sistema de señalización endocannabinoide en esta patología neurodegenerativa:

1. Determinar las posibles alteraciones que se dan en los distintos elementos del SCE en muestras de tejido cerebral de pacientes afectados por algún tipo de SCA.
2. Identificar las posibles alteraciones que se dan en los distintos elementos del SCE durante el progreso de la enfermedad en un modelo animal de la SCA3.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Caracterización del sistema endocannabinoide en tejido cerebral de pacientes con distintos tipos de ataxia espinocerebelosa

La mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas han sido estudiadas en cuanto a posibles cambios en diferentes elementos del sistema endocannabinoide utilizando muestras *post mortem* obtenidas a partir de biobancos. Esta es una fuente precisa y muy valiosa de información en las condiciones en las que la patología se expresa en pacientes, aunque es cierto que suele asociarse con los estadios más avanzados de la patología. Por tanto, parece importante, determinar los cambios que se pudieran dar en este sistema de señalización también en el caso de las ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes. El primer objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido determinar las posibles alteraciones que se dan en los diferentes componentes del SCE en muestras de tejido cerebral de pacientes afectados por algún tipo de SCA, específicamente en aquellas causadas por la presencia de mutaciones que producen la expresión de determinadas proteínas con un tracto anormal de glutaminas. Para ello, se ha trabajado en este diseño experimental con muestras humanas *post mortem* de enfermos de alguno de los tipos más representativos de SCAs y sus respectivos controles. Se eligió el cerebelo como región de interés por ser esta la estructura más comúnmente afectada en todas las SCAs. En estas muestras se llevaron a cabo dos tipos de estudios inmunohistoquímicos: (i) caracterización de los rasgos neuropatológicos de la enfermedad y (ii) análisis de los patrones de expresión de diferentes elementos del SCE (receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y enzimas de degradación, FAAH y MAGL) por el importante papel que desempeñan en la señalización cannabinoide y porque estas serían probablemente las mayores dianas farmacológicas para un tratamiento neuroprotector. Con el fin de identificar los tipos celulares específicos donde se expresan los componentes del SCE se utilizó la técnica de doble inmunofluorescencia combinada con microscopía confocal.

◦ Sujetos del estudio

Se trabajó con secciones de cerebelo humano embebido en parafina que fueron obtenidas del *Netherlands Brain Bank* (NBB; Amsterdam, Holanda). Se emplearon muestras de tejido de pacientes que habían sido diagnosticados con algún tipo de ataxia espinocerebelosa de carácter autosómico dominante, así como de sujetos control elegidos por características de edad, género e intervalo *post mortem* equivalentes a los pacientes de SCA (Tabla 1).

El número de tipos de SCA en el NBB, así como en otros biobancos consultados, que cumpliesen los criterios de inclusión era pequeño, por lo que nuestro grupo experimental tuvo

que formarse utilizando un sólo caso de los tipos más representativos de SCAs, todas ellas poliglutaminopatías. Para la elección de los casos utilizados en el estudio se consideró el historial de medicación e intoxicación de los pacientes de SCA y de los sujetos control proporcionados por el NBB. La mayoría de pacientes de SCA habían sido tratados con benzodiacepinas (por ejemplo, clonazepam, temazepam y diazepam), sustancias de acción GABAérgica (por ejemplo, baclofeno y gabapentina) y, en algunos casos, antidepresivos tricíclicos (por ejemplo amitriptilina). Estos pacientes fueron también tratados esporádicamente con antibióticos (por ejemplo, amoxicilina), y todos ellos recibieron morfina durante los últimos días/ horas antes de la muerte. Un paciente (sujeto número 7) fue tratado con nabilona 6 años antes de la muerte, pero el tratamiento no fue efectivo. Se excluyeron del estudio todos aquellos casos con una historia previa de adicción al tabaco, alcohol o consumo de cannabis, lo que redujo en casi un 50% el número de muestras disponibles. Esto es otra razón por la que el tamaño de muestra utilizado fue pequeño. Los sujetos control también se seleccionaron en base a su historial de medicación e intoxicación. Algunos de los sujetos control habían sido diagnosticados con carcinoma de colon y, por tanto, al igual que algunos de los pacientes de SCA, también recibieron morfina durante los últimos días/horas antes de la muerte.

Los datos neuropatológicos proporcionados por el biobanco confirman que todos los casos control no presentaban ninguna evidencia de enfermedad neurológica y ningún hallazgo patológico en el análisis *postmortem*. Las causas de la muerte fueron en estos casos fallo cardíaco, aneurisma aórtico abdominal y cáncer de colon. Por otro lado, el análisis *postmortem* de los casos de SCA proporcionado por el biobanco mostró una atrofia marcada del cerebelo y la protuberancia (tamaño pequeño, presencia de gliosis, y evidente pérdida neuronal), pero sin importantes cambios en las restantes áreas del cerebro, por ejemplo, la sustancia negra presentaba un aspecto normal, el *locus coeruleus* era visible y el sistema ventricular no estaba dilatado.

Se utilizaron cinco casos por grupo experimental y con las secciones de tejido de 8µm se llevaron a cabo técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Tabla 1. Muestras de cerebro usadas en los estudios de Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia.

Paciente	Edad	Género	Diagnóstico	Intervalo <i>postmortem</i>
1	56	M	Control	325 min
2	62	M	Control	480 min
3	66	M	Control	465 min
4	83	F	Control	315 min
5	88	F	Control	355 min
6	54	M	SCA3	315 min
7	59	M	SCA2	310 min
8	61	M	SCA	325 min
9	82	F	SCA7	305 min
10	86	F	SCA6	395 min

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL II: Caracterización del sistema endocannabinoide en un modelo animal de ataxia espino cerebelosa tipo 3

Tras los estudios en muestras humanas, nos planteamos trabajar con un nuevo modelo experimental de SCAs en ratón. No existen muchos modelos animales disponibles debido en parte a la variabilidad de las SCAs (algunas con mutaciones aún desconocidas), y en parte a la dificultad de modelizar de la forma más completa la patología en ratón. Nuestro trabajo se ha desarrollado en un modelo de SCA3, la ataxia dominante más prevalente, cuyas características se describen más adelante. Lo primero para lo que se utilizaron estos ratones fue para caracterizar la progresión de la enfermedad en este modelo animal. Para ello, se realizaron diferentes pruebas de comportamiento que permiten estudiar diferentes aspectos de las capacidades motoras (Rotarod, barra de equilibrio, *hanging wire*, *claspig* y *footprinting*). Por otro lado, en estos animales también se analizaron las alteraciones de la actividad metabólica en distintas regiones del encéfalo mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET). Los resultados obtenidos en las pruebas comportamentales y en los estudios de neuroimagen nos permitieron establecer diferentes estadios en el desarrollo de la enfermedad: (i) una fase sintomática temprana (hasta las 16 semanas de edad); (ii) una fase sintomática intermedia (desde las 16 hasta las 32 semanas de edad); y (iii) una fase avanzada de la enfermedad (desde las 35 semanas hasta las 56 semanas de edad). Los animales se sacrificaron a cada uno de estos tres estadios, cada uno de ellos representativo de una etapa de la enfermedad, y se recogieron muestras de las diferentes regiones del encéfalo que se ven principalmente afectadas en la SCA3: el cerebelo, el tronco cerebral y el estriado. En estas muestras se estudiaron las alteraciones neuropatológicas y bioquímicas características de procesos neurodegenerativos mediante técnicas histológicas, RT-PCR y *western-blot*.

Una vez caracterizada la progresión de la enfermedad a niveles comportamental, bioquímico y neuropatológico en este modelo, se procedió al estudio de las posibles alteraciones que se dan en la expresión de los diferentes elementos del SCE en cada uno de los estadios de la enfermedad. Para ello se midieron los niveles de los principales ligandos endógenos del SCE: la AEA y algunas *N*-aciletanolaminas relacionadas, así como el 2-AG y otros diacilgliceroles, en las tres regiones cerebrales seleccionadas (cerebelo, tronco cerebral y estriado) y a cada una de las edades establecidas previamente, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC/MS, del inglés *Liquid Chromatography / Mass Spectrometry*). Para el estudio de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ así como de las enzimas implicadas en el metabolismo de endocannabinoides (FAAH, MAGL, NAPE y DAGL) se utilizaron las técnicas de RT-PCR, *western-blot* e inmunohistoquímica.

Se analizó también la presencia de heterodímeros del receptor CB₁ en el cerebro de ratones SCA3 y ratones *wildtype*, en concreto nos interesamos por los heterómeros CB₁-A_{2A} y CB₁-CB₂ que se midieron mediante la técnica de *Proximity ligation Assay* (PLA).

◦ Animales de experimentación

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones transgénicos CMVMJD135, cedidos por la Dra. Patricia Maciel (Universidade de Minho, *School of Health Sciences*, Braga, Portugal). Estos ratones expresan el ADN de la variante *c* del gen de la ataxina 3 humana, que

contiene 135 repeticiones del triplete CAG. El grupo de la Dra. Maciel ya estudió como estos animales desarrollan de forma progresiva los síntomas motores típicos de la SCA3 (Silva-Fernandes et al., 2014), pero nosotros quisimos, como ya se ha comentado antes, realizar una caracterización de la evolución clínica y neuropatológica de estos animales, antes de su uso para experimentos sobre el sistema endocannabinoide. Para ello, los ratones se mantuvieron estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid en condiciones controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa ($55\pm 10\%$), con un ciclo diario de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Se agruparon en un máximo de 5 animales por jaula con agua y comida *ad libitum*. Con el fin de aumentar el grado de homocigosis y generar animales genéticamente idénticos la colonia se mantuvo como una línea consanguínea mediante el cruce hermano-hermana. Para todos los experimentos se utilizaron siempre animales machos.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo protocolos normalizados de trabajo según la normativa europea para el correcto manejo de animales de experimentación (directiva 86/609/EEC) y de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid. En todo momento se siguieron las recomendaciones de reemplazo, reducción y refinamiento. El protocolo seguido para cada una de las técnicas, así como el método de sacrificio llevado a cabo en cada caso, se detallan en el apartado correspondiente.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1. Estudio del SCE en pacientes con ataxia espinocerebelosa

2.1.1. Inmunohistoquímica

El protocolo empleado fue descrito previamente por Tsou et al. (1998) y Benito et al. (2003). Las secciones de tejido se desparafinaron y rehidrataron por inmersión, en orden sucesivo, en xilol, etanol 100°, etanol 96°, etanol 70° y agua. Posteriormente, las muestras se lavaron en solución salina tamponada con fosfato potásico (KPBS, del inglés *potassium phosphate buffered saline*) 50mM, pH 8. Con el fin de obtener un marcaje inmunohistoquímico más eficiente, las secciones de tejido se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico (Shi et al., 2001). En dicho proceso, las muestras se sometieron a alta temperatura y alta presión durante 2 minutos en una solución de desenmascaramiento antigénico a pH 9 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Después, las muestras se atemperaron, se lavaron en KPBS y se incubaron en una solución de bloqueo de la peroxidasa (DakoCytomation) a temperatura ambiente durante 30 minutos para bloquear la peroxidasa endógena. Tras varios lavados en KPBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (ver detalles en la Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos se diluyeron en KPBS que contenía un 1% de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) (Sigma, St. Louis, MO) y 1% Triton X-100 (Sigma Chem., Madrid, España).

Anticuerpo	Dilución (IHQ)	Dilución (IF)	Clase	Fabricante
anti-CB ₁ : PA1-743	1:300	1:100	P	Affinity BioReagents, IL, EEUU
anti-CB ₂ : MAB3655	1:100	1:50	M	R&D Systems, MN, EEUU
anti-FAAH: sc-26248	1:75	1:75	P	Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU
anti-MAGL: ab24701	1:25	1:25	P	Abcam, Cambridge, UK
anti-Calbindina D-28K: C9848	1:500	1:300	M	Sigma Chem., Madrid, España
anti-Calbindina D-28K: AB1778		1:250	P	Millipore, Billerica, MA, EEUU
anti-GFAP-Cy3: C9205		1:1500	M	Sigma Chem., Madrid, España
anti-GFAP: MCA4733	1:500		M	AbD Serotec, Oxford, UK
anti-Iba-1: 019-19741	1:1000	1:1000	P	Wako, Osaka, Japón
anti-Iba-1: ab5076		1:75	P	Abcam, Cambridge, UK
anti-CD68: M0814		1:50	M	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de inmunohistoquímica en inmunofluorescencia. Se muestran los anticuerpos primarios utilizados en el estudio: dilución, clase y fabricante. IHQ, inmunohistoquímica; IF, Inmunofluorescencia; P, Policlonal; M, Monoclonal.

Después de la incubación, las secciones se lavaron en KPBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados de cabra anti-conejo, caballo anti-ratón o caballo anti-cabra (1:200) (Vector Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para obtener el producto visible de la reacción se utilizó el complejo Avidina-Biotina para amplificar la señal (Vector Elite) y la 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) como sustrato (DakoCytomation), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones se deshidrataron, se sellaron con un cubreobjetos y se almacenaron en oscuridad hasta su observación al microscopio.

Para asegurar la especificidad de los anticuerpos utilizados se realizaron controles negativos incubando en ausencia del anticuerpo primario y co-incubación de los anticuerpos con las proteínas inmunogénicas correspondientes.

Para las observaciones y toma de fotografías de las preparaciones obtenidas en los experimentos de inmunohistoquímica se emplearon tanto un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) como una cámara DFC300FX, respectivamente. Se tomaron cinco microfotografías de alta resolución con el objetivo 20x y en las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. Para el análisis de las imágenes obtenidas en los experimentos de inmunohistoquímica se usó el programa de análisis de imágenes ImageJ (NIH, EE.UU).

Para la cuantificación de la expresión de las distintas proteínas se midió la densidad media de marcaje en un área seleccionada (Mausset-Bonnefont et al., 2003). Las regiones del cerebelo que se analizaron fueron la capa granular de la corteza del cerebelo, la sustancia blanca que rodea los núcleos profundos y la sustancia blanca próxima a la corteza cerebelosa. Se midió también la densidad media de marcaje en células individuales: las células de Purkinje (aproximadamente 10 células por muestra de pacientes y 25 células por muestra en los sujetos control) y las neuronas de la núcleo dentado (aproximadamente 25 células por muestra, en

ambos grupos). El análisis se llevó a cabo de manera independiente para cada una de las regiones estudiadas. Todos los datos se expresan en unidades arbitrarias.

2.1.2. Inmunofluorescencia

Para identificar poblaciones celulares específicas se realizaron estudios de colocalización con inmunofluorescencia utilizando marcadores específicos para las células de Purkinje (calbindina), macrófagos/microglía (CD68, Iba-1) y astrocitos (GFAP) (Tabla 2). Tras el proceso de desenmascaramiento antigénico, las secciones de tejido se lavaron con tampón Tris-salino (TBS, del inglés *Tris-buffered saline*) pH 7.5, antes de ser incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal específico para un tipo celular (calbindina, CD68, Iba-1 o GFAP, ver detalles en Tabla 2). Tras varios lavados con TBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa-546 (10µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas a 37°C, obteniendo marcaje rojo fluorescente. En el caso del marcador de astrocitos, GFAP, el tejido fue incubado 2 horas a 37°C con el anticuerpo anti-GFAP-Cy3, obteniendo marcaje rojo fluorescente. A continuación, tras una serie de lavados con TBS, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios para CB₁, CB₂, FAAH o MAGL. Posteriormente, las secciones se lavaron de nuevo con TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa-488 (10µg/ml) (Invitrogen) durante 2 horas, obteniendo marcaje verde fluorescente. La enzima FAAH se visualizó por incubación con el anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado durante toda la noche a 4°C, seguido por incubación con el conjugado streptavidina-Alexa-488 (10µg/ml) (Invitrogen) durante 2 horas a 37°C, como se describió anteriormente (Núñez et al., 2004). Con el fin de localizar los núcleos, las secciones se tiñeron durante 10 minutos con la tinción TOPRO-3-ioide (Molecular Probes, OR, EEUU) obteniendo un marcaje fluorescente azul.

Para eliminar la autofluorescencia endógena, las secciones de tejido se trataron con 1% de Negro Sudán en etanol al 70% durante 5 minutos, y se decoloraron con etanol al 70% (Schnell et al., 1999). Las secciones se sellaron con un cubreobjetos utilizando una solución acuosa (Vectashield; Vector Laboratories). Estas preparaciones se guardaron a 4°C hasta su análisis.

Para las observaciones y toma de fotografías se empleó un microscopio confocal Leica TCS SP5 con láseres de argón y helio-neón (Leica, Wetzlar, Alemania). Se llevó a cabo una visualización diferencial de los fluoróforos a través del uso de filtros específicos: Alexa 488, Alexa 546, Cy3 y TOPRO-3. En algunos casos, las imágenes se procesaron con el *Software* Leica LAS AF lite para obtener las proyecciones tridimensionales ortogonales.

2.2. Estudio del SCE en un modelo animal de SCA3

2.2.1. Genotipado de la colonia de ratones SCA3

El genotipado de los ratones transgénicos se realizó usando ADN genómico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) que se describe a continuación:

- ADN de cada muestra: 100 ng
- Tampón Taq polimerasa 1x
- MgCl₂: 0,16 mM
- dNTPs mix: 0,6 mM
- Enzima Taq polimerasa: 1U
- Oligonucleótidos: Para la detección de ataxina 3 humana se utilizaron los oligonucleótidos TR1 (5' GAA GAC ACC GGG ACC GAT CCA G 3') y TR2 (5' CCA GAA GGC TGC TGT AAA AAC GTG C 3') (66 ng), para la detección de la ataxina 3 murina, utilizada como control interno de la reacción de PCR, se utilizaron los oligonucleótidos mmjd89 (5' GCT AGC TAG AGC TAC TTA TTG 3') y mmjd54 (5' GAC TCC AGA GAG CAC CTG 3') (33 ng).

El protocolo de PCR utilizado para la amplificación de los genes fue el siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial del ADN a 95°C, 35 ciclos de tres pasos (1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de anillamiento o unión de oligonucleótidos a 60°C y 1 minuto de extensión de la cadena de ADN) seguido de una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de PCR (10µl) se resolvieron en geles de Agarosa/TBE 1x al 2% y se visualizaron con Gel Red en un transiluminador de luz ultravioleta. Los animales WT presentaban una banda de 550 pb, correspondiente a la ataxina 3 murina, y los animales SCA3 presentaban dos bandas, una de 550 pb, la ataxina murina, y otra de 450 pb, que corresponde a la ataxina 3 humana.

2.2.2. Determinación de parámetros comportamentales

La caracterización de las alteraciones motoras que se dan en el transcurso de la enfermedad se llevó a cabo mediante diferentes pruebas de comportamiento que permiten estudiar diferentes aspectos de las capacidades motoras: hanging wire (fuerza motora), barra de equilibrio (equilibrio), Rotarod (coordinación), clasping (distonía) y footprinting (marcha). Todas estas capacidades motoras reflejan bien las posibles alteraciones que aparecen a nivel sintomatológico en la SCA3 en pacientes, por lo que permiten una buena aproximación al estado clínico (neurológico) de los animales. Además de a nivel motor, durante el progreso de la enfermedad de los animales SCA3 se siguió con atención el estado de salud general de los animales mediante la monitorización del peso y la observación de su apariencia física.

2.2.2.1. *Hanging Wire*

La fuerza motora de los animales se evaluó mediante el test de hanging wire (Figura 2). Esta prueba consiste en medir el tiempo que el animal permanece suspendido en una rejilla suspendida en el aire. El animal se coloca sobre una rejilla que, tras ser agitada levemente para asegurar que el ratón se agarre, se invierte y se suspende a 30cm de la jaula. Se mide el tiempo que el animal tarda en caer, con un tiempo máximo para la prueba de 60 segundos (Silva-Fernandes et al., 2014).

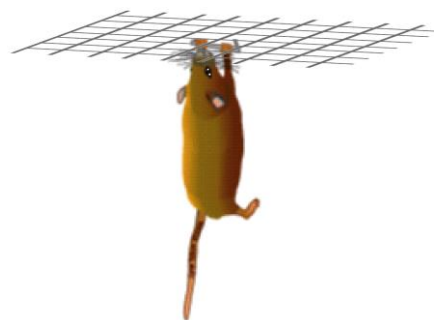


Figura 1. Test de hanging wire. Figura adaptada del UCLA Behavioral Testing Core Facility.

Esta prueba se repite tres veces. El rendimiento para cada sesión se presenta como la media de las tres pruebas realizadas. La prueba se realizó una vez al mes desde las 7 semanas hasta las 31 semanas de edad, cuando los animales transgénicos presentaban dificultades importantes para permanecer suspendidos en la rejilla.

2.2.2.2. *Barra de equilibrio*

La coordinación motora y equilibrio de los ratones se analizó mediante la prueba de la barra de equilibrio (Hübener et al., 2011). En esta prueba se hace pasar a los ratones por dos barras circulares de madera, de 1 metro de largo y 27 y 10 mm de diámetro respectivamente (Figura 2), suspendidas en el aire a unos 60 cm del suelo.

Tras tres entrenamientos iniciales, y después de 24 horas de descanso, se realizan tres pruebas definitivas. Se mide el tiempo que el animal tarda en recorrer 80cm, con un tiempo máximo para la prueba de 60 segundos. El valor final para cada animal se presenta como la media de las tres pruebas realizadas. La prueba se realizó una vez al mes, desde la 7ª semana hasta las 31 semanas de edad, cuando los animales transgénicos presentaban serios problemas para desarrollar correctamente la prueba.



Figura 2. Test de la barra de equilibrio. Figura tomada del UCLA Behavioral Testing Core Facility.

2.2.2.3. Rotarod

La prueba de Rotarod es una prueba para la evaluación de la función y coordinación motora en modelos animales experimentales, descrita inicialmente para evaluar lesiones y efectos de fármacos sobre la coordinación motora de roedores debidos a la actividad de los ganglios basales y cerebelo (Monville et al., 2006), por lo que se viene utilizando para distintas enfermedades con sintomatología motora (por ejemplo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica). Aunque los cambios en la respuesta en el Rotarod tiene diferente origen en cada patología en el caso de las SCAs se debe claramente a alteraciones en la coordinación motora, frente a la distonía típica de la enfermedad de Huntington (que también se da en las SCAs), en la rigidez e inhibición motora de la enfermedad de Parkinson o la debilidad muscular de la ELA.

El Rotarod consiste en una barra monitorizada que puede girar a una velocidad constante o con aceleración. Sobre esta barra se coloca al animal perpendicular al eje mayor de la barra con la cabeza orientada en sentido contrario al de rotación (Figura 3). El protocolo utilizado en esta prueba fue el descrito por la International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens (IMPRESS). Inicialmente los ratones son entrenados a velocidad constante (4 r.p.m) durante al menos tres veces con un tiempo de descanso entre entrenamientos de 10 minutos. Tras el entrenamiento, se deja media hora de descanso y, a continuación, se llevan a cabo tres medidas definitivas con una aceleración de 4 a 40 r.p.m. en 5 minutos, tiempo máximo de permanencia en la barra, dejando entre cada una de las pruebas un intervalo mínimo de 15 minutos. Se registran los tiempos de permanencia en el Rotarod para cada animal. Los valores de permanencia se normalizan respecto al primer día que se realiza la prueba. El valor final de permanencia en Rotarod para cada animal se presenta como la media de las tres pruebas realizadas. La prueba se realizó una vez al mes desde la 7ª semana de edad hasta el sacrificio de los animales a las 56 semanas.



Figura 3. Test de Rotarod. Figura tomada del UCLA Behavioral Testing Core Facility.

2.2.2.4. *Clasping*

En los ratones transgénicos de SCA3 se observa la aparición de un signo neurológico conocido como “*clasping*” que se relaciona con la distonía que padecen los pacientes de SCA (también evidente en la enfermedad de Huntington). Este reflejo consiste en la contracción de las patas traseras hacia el abdomen del ratón cuando éste se encuentra suspendido por la cola unos 10 cm sobre la jaula (Figura 4).



Figura 4. Test de clasping. Figura tomada del UCLA Behavioral Testing Core Facility.

Para esta prueba se suspende a los animales durante un minuto y se asigna un valor a cada grado de distonía: un valor de 0 en el caso de no presentar *clasping*, 1 cuando encogen una de las patas traseras, 2 cuando encogen las dos patas traseras y 3 cuando encogen todo el tronco inferior (Guyenet et al., 2010). Los datos para cada grupo experimental corresponden a la media de tres pruebas y se expresan en porcentaje normalizado respecto al valor medio del grupo control. La prueba se realizó desde la 31ª semana de edad hasta el sacrificio de los animales a las 56 semanas de edad.

2.2.2.5. *Footprinting*

Otra de las anomalías motoras que se estudió en el modelo de SCA3 fue la manera de caminar y, concretamente, la longitud y uniformidad del paso. Lo que corresponde con uno de los principales síntomas que tienen los pacientes que es la marcha atáxica (falta de equilibrio al caminar). Estas anomalías se analizaron mediante el test de patrón de huellas o “*Footprinting*” (Figura 5).



Figura 5. Test de Footprinting. Figura tomada del UCLA Behavioral Testing Core Facility.

Este test consiste en pintar las plantas de las patas del ratón (las patas delanteras de los animales se pintaron de rojo y las traseras de azul) y dejarle caminar por un pasillo, de 50cm de largo y 10cm de ancho, sobre un papel (Hübener et al., 2011). La prueba se realizó en la fase más avanzada de la enfermedad, a las 56 semanas, antes de sacrificar a los animales.

2.2.2.6. *Otras observaciones sobre la situación clínica de los animales*

Además de las capacidades motoras de los ratones SCA3, se estudió el estado de salud general de los animales a medida que progresaba la enfermedad. Para ello, se evaluó el peso de los animales una vez al mes desde las 7 semanas de edad hasta su sacrificio a las 56 semanas de edad. Por otro lado, durante todo el tiempo que los animales se mantuvieron estabulados, se evaluó la apariencia física de los animales transgénicos en comparación con sus hermanos *wildtype* de camada. Esto es, por ejemplo, si los animales presentaban hipoactividad o letargo,

alteraciones en conductas naturales de estos animales como el acicalamiento (en inglés, *grooming*), la presencia de estereotipias o la aparición de deformaciones en la columna vertebral, en la región dorsal, conocida como cifosis, una alteración que se ha observado previamente en otros modelos de la SCA3 (Gould, 2012; Riess et al., 2008). Para determinar estas alteraciones de la columna, además de la observación de la apariencia física de los animales, se analizaron las imágenes anatómicas obtenidas mediante Tomografía Computerizada (CT, del inglés *computed tomography*), una técnica de imagen que utiliza radiación X para obtener imágenes detalladas de objetos anatómicos, en nuestro caso para obtener una imagen anatómica de los huesos.

2.2.3. Análisis de supervivencia

En los experimentos de caracterización de la progresión de la patología en los ratones SCA3, también quisimos conocer su supervivencia en comparación con los animales *wildtype*. Para este estudio de supervivencia se registró el tiempo transcurrido desde el nacimiento de los animales hasta su muerte. Para la comparación entre los datos de ambos grupos experimentales se utilizó el estimador no paramétrico de Kaplan–Meier (Kaplan y Meier, 1958).

Los animales SCA3 murieron antes que los animales *wildtype* como consecuencia de los síntomas asociados a la enfermedad debido a esto, y con el fin de evitar el sufrimiento de los animales *wildtype*, se decidió poner punto y final al experimento de supervivencia a las 93 semanas de edad, cuando se sacrificaron los animales que aún sobrevivían a esa edad.

2.2.4. Análisis de la actividad metabólica cerebral mediante Tomografía por Emisión de Positrones

En los experimentos de caracterización del fenotipo patológico de los ratones transgénicos SCA3, también se evaluó la actividad metabólica de distintas áreas del encéfalo *in vivo* mediante tomografía por emisión de positrones (PET). Las técnicas de imagen molecular *in vivo* son técnicas no invasivas que permiten visualizar procesos fisiológicos en seres vivos de forma temprana, antes incluso de que se produzca cualquier cambio anatómico (también cuando se producen). Dentro de la imagen molecular, la tomografía por emisión de positrones es una técnica que permite obtener información metabólica a escala molecular.

Para realizar el estudio PET es necesario la aplicación previa de un radiofármaco. El radiofármaco más usado para el análisis de la actividad metabólica mediante PET es la 2-Desoxi-2-[^{18}F]fluoro-D-glucosa (^{18}F -FDG) una molécula análoga de la glucosa que ingresa a las células y usando los mismos transportadores que la glucosa convirtiéndola en ^{18}F -FDG-6 fosfato, pero a partir de este punto no continúa la vía glicolítica y es acumulada intracelularmente como ^{18}F -FDG libre, incorporada a glucógeno o formando parte de glicolípidos y glicoproteínas. Tras un tiempo de espera para asegurar una adecuada captación, la distribución del ^{18}F -FDG-6 fosfato en el cerebro refleja de forma directamente proporcional a su potencial uso a nivel metabólico.

Los estudios de imagen molecular se realizaron en las instalaciones del CAI de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar de la UCM. Durante el tiempo que los animales permanecieron en las instalaciones del CAI, se estabularon en un rack ventilado Boxunns (Tecniplast SPA, Buguggiate, Italia), con agua y pienso *ad libitum*.

Para la realización de los estudios PET, 10 horas antes del inicio de los estudios, se dejó a los animales en ayunas, para evitar así la interferencia de la glucosa plasmática con el radiotrazador ^{18}F -FDG. Se administró aproximadamente 11,1 MBq (300 μCi) del radiotrazador ^{18}F -FDG por vía intraperitoneal (i.p) dejando un tiempo de incorporación de aproximadamente 45 minutos antes de la adquisición tomográfica, con el fin de asegurar la distribución de la ^{18}F -FDG a nivel encefálico. Una vez transcurrido el tiempo de incorporación se procedió a la obtención de las adquisiciones tomográficas. El protocolo empleado fue descrito previamente por García-García et al. (2014).

Dicho protocolo consistió en una adquisición PET de 20 minutos seguida inmediatamente de una adquisición CT., que sirve para la validación anatómica de las señales de la ^{18}F -FDG. El equipo utilizado es un tomógrafo híbrido PET-CT Albira ARS (Oncovision, Valencia, España), con una resolución PET de 1.5 mm y un campo axial de 4 cm y transaxial de 8 cm. Para asegurar la inmovilización de los animales durante los registros tomográficos, los ratones se anestesiaron con isoflurano (inducción 5% isoflurano; mantenimiento 2% isoflurano, ambos en 100% oxígeno). Una vez finalizadas las adquisiciones, todas las imágenes PET se reconstruyeron mediante el algoritmo iterativo OSEM y se les aplicaron las correcciones de tiempo muerto *decay*, *scatter* y *random*.

Con el fin de cuantificar la captación de ^{18}F -FDG en las áreas de estudio, se procedió al correregistro de la imagen anatómica obtenida mediante CT con la imagen PET. Esto permitió delinear los volúmenes de interés (VOIs, del inglés *volumen of interest*), obteniéndose de esta manera la actividad media (kBq/cc) captada por las distintas estructuras. Este proceso se realizó con el programa informático PMOD versión 3.0 (Pmod Technologies, Zurich, Suiza).

Para corregir las variaciones en la dosis inyectada y en el tiempo de incorporación desde el momento de la inyección hasta la adquisición, los datos obtenidos se normalizaron teniendo en cuenta el valor de captación estándar (SUV, del inglés *standard uptake value*), calculando la relación entre la concentración de radioactividad en el tejido (kBq/ml) a un tiempo determinado y la dosis inyectada en el momento de la adquisición PET (kBq) dividido por el peso del ratón (g). Obteniéndose por tanto el valor de SUV en g/ml (García-García et al., 2014).

2.2.5. Técnicas Bioquímicas

2.2.5.1. Preparación de muestras

Los animales utilizados para los estudios bioquímicos se sacrificaron por dislocación cervical, tras lo cual se extrajo el encéfalo y se diseccionaron el cerebelo, el tronco cerebral y el estriado, que se congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

2.2.5.2. *Determinación de endocannabinoides y N-aciletanolaminas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas Cuadrupolar*

La concentración de varias N-aciletanolaminas (como la AEA, la PEA y la OEA) así como 2-diacylglicerol (2-AG y 2-OG) en diferentes tejidos cerebrales del modelo de SCA3 se determinó mediante un cromatógrafo líquido de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo 1100 LC/MSD SL; Agilent, CA, EEUU). Estas determinaciones se realizaron en el Departamento de Farmacología y Toxicología del Medical College of Wisconsin (Milwaukee, WI, EEUU).

Para llevar a cabo estas medidas las muestras se procesaron según el protocolo descrito previamente por Patel et al. (2003) con algunas modificaciones. Las muestras se pesaron, aún congeladas, y se homogeneizaron en tubos de cristal de borosilicato con una solución de 2 ml de acetonitrilo puro que contenía 84 pmol de [$^3\text{H}_8$] AEA y 186 pmol de [$^3\text{H}_8$]2-AG (Cayman Chemical, MI, EEUU), utilizados como estándares internos. La homogeneización de las muestras se hizo en frío mediante sonicación durante 1 hora.

A continuación, las muestras se incubaron durante toda la noche a -20°C para precipitar las proteínas. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 g, el sobrenadante se recuperó y el disolvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. Para recuperar todos los lípidos que pudieran haber quedado adheridos a las paredes del tubo, las muestras se resuspendieron en 300 μl de metanol y se secaron de nuevo con una corriente de nitrógeno. Finalmente, el extracto lipídico obtenido se resuspendió en 20 μl de metanol, 5 μl de los cuales se utilizaron para su análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Para evitar la degradación de los endocannabinoides las muestras se analizaron en un periodo siempre inferior a 7 días.

Las muestras se separaron en un sistema de HPLC (del inglés *high performance liquid chromatography*) mediante una columna de fase reversa Kromasil C18[®] (250 mm de longitud \times 2 mm de diámetro y 5- μm de tamaño de partícula) y dos fases móviles: una fase móvil A (agua desionizada, acetato amónico 1mM y ácido acético 0.005%) y una fase móvil B (metanol, acetato amónico 1mM y ácido acético 0.005%). Las muestras se eluyeron a un flujo de 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ mediante un gradiente lineal. Para cada una de las muestras el porcentaje de disolvente B se incrementó linealmente desde un 85% hasta el 100%, en 25 minutos, y se mantuvo al 100% durante 10 minutos. En los diez minutos siguientes el disolvente B se disminuyó linealmente desde el 100% hasta el 85% y se mantuvo a 85% otros 10 minutos.

El eluyente se monitorizó en un espectrómetro de masas cuadrupolar, con sistema de ionización química a presión atmosférica mediante electrospray en plano ortogonal. La detección se realizó en modo de ion positivo, usando un sistema de monitorización selectivo de los iones de interés.

Para calibrar el sistema se usaron curvas estándar para la AEA, PEA, OEA, 2-AG y 2-OG (Cayman Chemical). La concentración de cada endocanabinoide en las distintas muestras se calculó por comparación con el área correspondiente a su estándar interno deuterado: [$^3\text{H}_8$] AEA para el cálculo de AEA, PEA y OEA, y [$^3\text{H}_8$]2-AG en el caso del 2-AG y 2-OG. Los valores de concentración obtenidos se normalizaron en relación al peso del tejido y se expresaron como porcentaje respecto al valor medio de los grupos control.

2.2.5.3. Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR

Para la extracción del ARN de las muestras de cerebelo, tronco encefálico y estriado de ratones *wildtype* y ratones transgénicos SCA3 se utilizó el kit comercial SurePrep RNA/Protein Purification (FisherScientific, Madrid, España). El ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. A continuación se procedió a realizar la reacción de transcripción reversa de 1 µg del ARN obtenido, mediante la utilización del kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen, Limburgo, Países Bajos). Este método incluye un primer paso de eliminación de ADN genómico, seguido de la reacción de la retro-transcriptasa.

Para cuantificar la expresión de los mensajeros se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real con 4 µl de ADNc por duplicado y utilizando como control de carga el gen de la GAPDH (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Se utilizó la mezcla de reacción FastStart Taqman® Probe Master de la casa comercial Roche (Madrid, España) y los primers y sondas específicos para cada transcrito se diseñaron, sintetizaron y comercializaron por Applied Biosystems (Madrid, España) (Tabla 3).

Tabla 3. Sondas Taqman utilizadas en la reacción de PCR cuantitativa.

Gen	Proteína	Referencia Applied Biosystems
GAPDH	GAPDH	Mm 99999915_ g1
CNR1	CB1	Mm 0043262_ s1
CNR2	CB2	Mm 00438286_ m1
FAAH	FAAH	Mm 00515684_ m1
MGLL	MAGL	Mm 00449274_ m1
DAGLA	DAGLα	Mm 00813830_ m1
NAPEPLD	NAPE	Mm 00724596_ m1
CALB1	Calbindina	Mm 00486647_ m1
ENO2	NSE	Mm 00469062_ m1
PPP1R1B	DARRP32	Mm00454892_m1
Slc1a2	GLT1	Mm 00441457_ m1
Slc1a3	GLAST	Mm 00600697_ m1
BDNF	BDNF	Mm01334042_m1
TNF	TNFα	Mm 99999068_ m1
IL1B	IL1β	Mm 00434228_ m1

El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1,25 µl de la mezcla de cebadores y sonda correspondiente, 2,5 µl de ARNt (30 ng/ml), 3,75 µl de agua ultrapura estéril, 12,5 µl de la mezcla TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (incluye los dNTPS, tampón de reacción y AmpliTaqGold® polimerasa) y 4 µl del ADNc obtenido tras las RT. En cada PCR se incluyeron los correspondientes controles negativos. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System siguiendo las recomendaciones del fabricante para este tipo de sondas. La cantidad de transcrito se calculó usando el método de la segunda derivada y cuantificación

relativa con corrección de eficiencias utilizando la versión 1.4 del programa informático Applied Biosystems Sequence Detection.

2.2.5.4. Técnica de Western-blot

Para estudiar los niveles de diferentes proteínas se llevaron a cabo ensayos de *western-blot* del cerebelo, tronco encefálico y estriado de ratones WT y ratones transgénicos modelo de SCA3. La extracción de proteína se llevó a cabo mediante el kit comercial SurePrep RNA/Protein Purification (FisherScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la concentración de proteína total en los extractos, se utilizó el kit Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, CA, EEUU) utilizando BSA como proteína estándar para construir la curva patrón. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Fisher Scientific Ltd, Leicestershire, Reino Unido). Las muestras se diluyeron con tampón de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol al 87% y β -mercaptoetanol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, los extractos proteicos (20 μ g) se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% con SDS. Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de Immobilon-P® (Millipore Corporation, Bedford, MA, EEUU) durante 1 hora a 100 voltios con una Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). A continuación se procedió a la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos.

Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se incubaron previamente en solución de bloqueo (5% leche desnatada en TBS con 0.1% de Tween-20 (TBST)) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar la solución bloqueante, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 4). Tras esta incubación se realizaron varios lavados en TBST, y seguidamente se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y específico de especie (Amersham ECL, GE Healthcare) diluido 1:5000 en la solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, tras varios lavados en TBST, el complejo inmune se visualizó por quimioluminiscencia, utilizando para ello el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la técnica de *Western-blot*. Se muestran los anticuerpos primarios utilizados en el estudio: dilución, clase y fabricante. P, Policlonal; M, Monoclonal.

Anticuerpo	Dilución	Clase	Fabricante
Anti-CB ₁ : Rb-Af380	1:300	P	Frontier Institute., Hokkaido, Japón
Anti-FAAH: 101600	1:200	P	Cayman Chem., MI, EEUU
Anti-Calbindina D-28K: AB1778	1:500	M	Millipore, MA, EEUU
Anti-poliQ: MAB1574	1:500	M	Millipore, MA, EEUU
Anti-Ataxina-3: MAB5360	1:500	M	Millipore, MA, EEUU
Anti-GAPDH: G8795	1:5000	M	Sigma Chem., Madrid, España

Las bandas correspondientes a las proteínas específicas se digitalizaron mediante un densitómetro GS-800 (Bio Rad) y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante su análisis densitométrico con el programa informático Quantity One 4.5.0 (Bio-Rad). Los datos se normalizaron respecto a la GAPDH, utilizada como control de carga, y se representan como porcentaje normalizado respecto al valor medio del grupo control.

2.2.6. Técnicas histológicas

2.2.6.1. Preparación muestras

Los animales utilizados para estudios histológicos se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (Imalgene® 500 - Rhône Mérieux, Lyon, Francia) / Xilacina (Rompún® - Bayer AG, Leverkusen, Alemania) (3:1) y se perfundieron transcárdialmente. La perfusión se realizó primero con tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) para eliminar la sangre y posteriormente con paraformaldehído al 4% en PBS para fijar los tejidos. Seguidamente se extrajo el encéfalo del animal que se mantuvo durante 12 horas a 4°C en el mismo fijador. Posteriormente, los cerebros se crioprotegieron manteniéndolos en sacarosa al 30% en PBS durante 48 horas a 4°C. Después, se congelaron en isopentano y se almacenaron a -80°C. Los cerebros congelados se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.U., Países Bajos) y se cortaron en un criostato Leica (Heerbrugg, Suiza) en secciones sagitales de 30µm de grosor que se almacenaron en solución anticongelante a -20°C hasta el día de su utilización.

2.2.6.2. Tinción de Azul de Metileno

Para esta tinción se utilizó una disolución de cloruro de metiltioninio (azul de metileno), un colorante básico que tiñe el núcleo y en menor medida el citoplasma de las células de color azul. Las secciones sagitales de cerebro congelado se montaron en portas previamente tratados con gelatina porcina (Sigma) y se dejaron atemperar durante al menos 30 minutos. A continuación, se incubaron con una solución de azul de metileno al 0.1% durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Las muestras se deshidrataron en pases sucesivos de 3 minutos de alcohol al 70%, al 96% y al 100%, seguido de un pase de 5 minutos con xilol. Todas las secciones, una vez deshidratadas, se montaron con medio de montaje no acuoso DPX (Fluka Analytical, Alemania)

Para la observación de las preparaciones y la toma de fotografías se empleó un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) y una cámara DFC300FX, respectivamente. Para el conteo del número de células se tomaron microfotografías de alta resolución con el objetivo 20x y en las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. Se analizaron 4 campos, de al menos 3 secciones y un mínimo de 5 animales por grupo. El valor final para cada uno de los grupos es la media de todos los animales incluidos en el estudio. Los datos se expresan como porcentaje normalizado respecto al número medio de células de los casos control.

2.2.6.3. Inmunohistoquímica

Se realizaron tinciones con anticuerpos específicos con el fin de estudiar la expresión de diferentes proteínas en distintas regiones encefálicas afectadas en la enfermedad. Las secciones de tejido congelado se montaron en portas gelatinizados y se dejaron atemperar durante al menos 30 minutos. Posteriormente, las muestras se hidrataron en KPBS 50mM, pH 8 durante 10 minutos y se permeabilizaron con tampón KPBS con 0.1% de Tritón X-100 durante 30 minutos. Para bloquear la actividad peroxidasa endógena las secciones se incubaron en una solución de bloqueo de la peroxidasa (DakoCytomation) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras varios lavados en KPBS, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C (Tabla 5). Los anticuerpos se diluyeron en KPBS conteniendo 1% de BSA y 0.1% de Triton X-100. Después de la incubación, las secciones se lavaron en KPBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo biotinilado (1:200) o de caballo anti-cabra biotinilado (1:200) (Vector Elite) durante 2 horas a temperatura ambiente. Para obtener el producto visible de la reacción se utilizó el complejo Avidina-Biotina para amplificar la señal y DAB como sustrato, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secciones se deshidrataron, se montaron con medio de montaje no acuoso, DPX y se almacenaron en oscuridad hasta su observación al microscopio. Para asegurar la especificidad de los anticuerpos utilizados se realizaron controles negativos incubando en ausencia del anticuerpo primario.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica en tejido murino. Se muestran los anticuerpos primarios utilizados en el estudio: dilución, clase y fabricante. P, Policlonal; M, Monoclonal.

Anticuerpo	Dilución	Clase	Fabricante
anti-CB ₁ : Rb-Af380	1:500	P	Frontier Institute, Hokkaido, Japón
anti-FAAH: sc-26427	1:200	P	Santa Cruz Biotechnology, CA, EEUU
anti-Calbindina D-28K: AB1778	1:250	P	Millipore, MA, EEUU
anti-GFAP: Z0334	1:500	P	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca
anti-Iba-1: 019-19741	1:300	P	Wako, Osaka, Japón
anti-Ub: Z0458	1:200	P	Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca

Para la observación de las preparaciones y la toma de fotografías se empleó un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) y una cámara DFC300FX, respectivamente. Para el conteo del número de células se tomaron microfotografías de alta resolución con el objetivo 20x y en las mismas condiciones de luz, brillo y contraste. Se analizaron 4 campos, de al menos 3 secciones y un mínimo de 5 animales por grupo. El valor final para cada uno de los grupos es la media del número de células de todos los animales incluidos en el estudio. Los datos se expresan como porcentaje respecto al grupo control.

2.2.6.4. Identificación de heterodímeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} mediante la técnica de *proximity ligation assay*

Para la detección de heterómeros del receptor CB₁ con otros receptores como el CB₂ y el A_{2A} las secciones de tejido congelado procedente del encéfalo de animales *wildtype* y animales transgénicos SCA3 se montaron en portas previamente gelatinizados y se atemperaron durante al menos 30 minutos antes de comenzar el experimento. Posteriormente, las muestras se hidrataron en PBS conteniendo 20 mM de glicina y se permeabilizaron usando el mismo tampón con un 0.05% de Tritón X-100. Después, se lavaron abundantemente en PBS y se procedió a la detección de los heterómeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} mediante el kit comercial Duolink® II in situ PLA detection (Olink, Bioscience Uppsala, Suecia) (Figura 6).

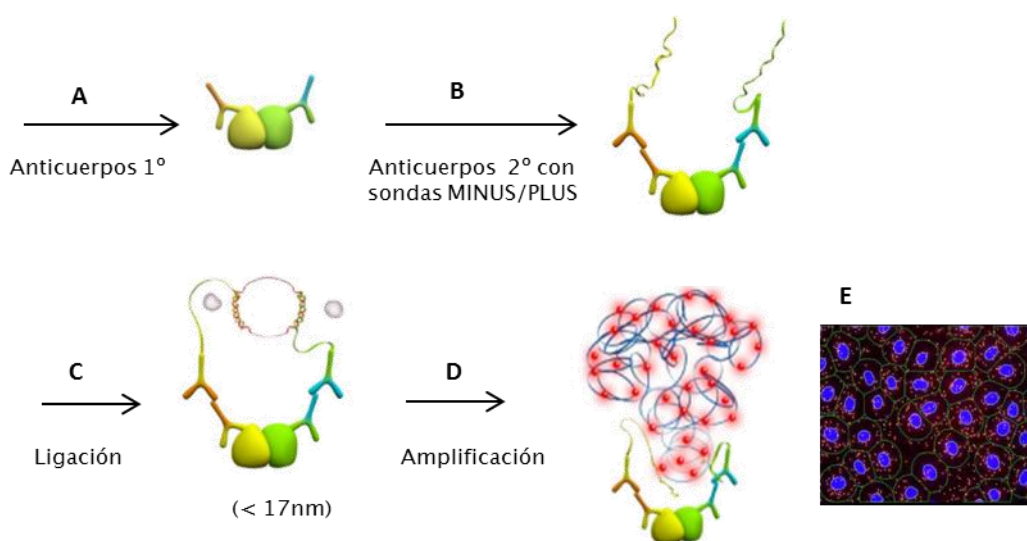


Figura 6. Representación esquemática de la técnica de PLA. La técnica de PLA consiste en una primera etapa de unión de anticuerpos específicos primarios (A), una segunda etapa de unión de los anticuerpos secundarios conjugados a las sondas de ADN PLUS y MINUS (B), que hibridan en presencia de oligonucleótidos (C) y se pueden amplificar emitiendo una señal fluorescente (D). Los heterómeros son visibles como manchas rojas en neuronas con el núcleo teñido en azul (E).

En dicho proceso las muestras se incubaron en una solución de bloqueo a 37°C durante 30 minutos. Después, las muestras se incubaron toda la noche en una cámara húmeda a 4°C en el medio de dilución de anticuerpo con una mezcla a partes iguales de los dos anticuerpos primarios correspondientes (

Tabla 6). Tras varios lavados con PBS, las secciones se incubaron con una mezcla equimolecular de las sondas Duolink® In Situ PLA probe anti-Mouse PLUS, Duolink® In Situ PLA probe anti-Rabbit PLUS o Duolink® In Situ PLA probe anti-Rabbit MINUS, según corresponda, durante 1 hora a 37°C. Después de lavar con tampón de lavado a temperatura ambiente, las muestras se procesaron para las etapas de ligación, amplificación y detección tal como se describe por el fabricante. Después del lavado exhaustivo a temperatura ambiente con tampón de lavado B, las células se montaron utilizando medio de montaje acuoso con el marcador de núcleos DAPI (Duolink® In Situ Mounting Medium, Duolink).

La amplificación se realizó con el kit Duolink® In Situ Detection Reagents Red el cual está constituido por nucleótidos de detección que emiten un marcaje rojo fluorescente cuando

ambos receptores se encuentran lo suficientemente cerca, debido a su heterodimerización, como para permitir que las dos sondas de ADN sean capaces de ligar ($< 17\text{nm}$) (Callén et al., 2012). Los heterómeros son visibles como manchas rojas en neuronas con el núcleo teñidos en azul. Para asegurar la especificidad de la técnica se realizaron controles negativos donde las secciones se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente unido a la sonda Duolink® PLA probe PLUS y posterior incubación con la sonda Duolink® PLA probe MINUS.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en la técnica de PLA. Se muestran los anticuerpos primarios utilizados en el estudio: dilución, clase y fabricante. P, Policlonal; M, Monoclonal.

Anticuerpo	Dilución	Clase	Fabricante
anti-CB ₁ : PA 1-745	1:100	P	Thermo Scientific, MA, EEUU
anti-CB ₂ : 101550	1:100	P	Cayman Chemical Company, MI, EEUU
anti-A _{2A} : 05-717	1:100	M	Millipore, MA, EEUU

Para las observaciones y toma de fotografías se empleó un microscopio confocal Leica SP2 (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Las imágenes se procesaron con el programa informático Fiji. Se tomaron seis microfotografías por animal sobre las que se cuantificó el número de células positivas para el correspondiente heterómero respecto al número de células totales (aproximadamente de 300 a 400 células por animal). El análisis se llevó a cabo de manera independiente para cada una de las regiones estudiadas. Los datos se expresan como el valor r , que corresponde al número de puntos positivos en relación al número de células que expresan el heterómero (Bonaventura et al., 2014).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los resultados experimentales se analizaron mediante diferentes tipos de tests estadísticos.

- Para hacer comparaciones en experimentos con solo dos grupos independientes se empleó la prueba paramétrica T de Student, seguida por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples o un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test *post hoc* de Newman-Keuls.
- Para comparar más de dos grupos se utilizó un análisis ANOVA con medidas repetidas seguido de un test *post hoc* de Newman-Keuls para comparaciones múltiples.
- Para comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se utilizó el test de contraste de hipótesis de Log-Rank.

El análisis estadístico se llevó a cabo con la versión 5.00 del programa informático GraphPad Prism. El tipo de análisis utilizado en cada caso se menciona en la correspondiente leyenda de cada figura.

IV. RESULTADOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL I: Caracterización del sistema endocannabinoide en tejido cerebral de pacientes con distintos tipos de ataxia espinocerebelosa

Se han descrito alteraciones en elementos específicos del sistema cannabinoide endógeno (es decir, ligandos, receptores y enzimas) en pacientes afectados por diferentes patologías como la enfermedad de Huntington (Blázquez et al., 2011; Palazuelos et al., 2009), enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003) o enfermedad de Parkinson (García et al., 2015; Gómez-Gálvez et al., 2015), entre otras. Sin embargo, los posibles cambios que se dan en el sistema cannabinoide endógeno en las SCAs aún no sido explorados hasta el desarrollo de esta tesis doctoral y estos estudios acaban de ser publicados (Rodríguez-Cueto et al., 2014a, 2014b). En este diseño experimental se estudió el patrón de expresión de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, y de las enzimas FAAH y MAGL en muestras de cerebelo procedentes de pacientes con SCA. Nuestros análisis se han centrado en el cerebelo, por ser esta la estructura comúnmente afectada en todas las SCAs, concretamente se analizaron los diferentes elementos del sistema cannabinoide endógeno en regiones de sustancia gris (corteza cerebelosa y núcleo dentado) y en áreas de sustancia blanca (la sustancia blanca subcortical a la corteza cerebelosa y la que rodea al núcleo dentado).

1.1. EVALUACIÓN NEUROPATOLÓGICA DEL CEREBELO DE LOS PACIENTES DE SCA

El primer paso en este diseño experimental fue confirmar que las muestras procedentes de los pacientes de SCA tenían las alteraciones neuropatológicas esperadas en este tipo de enfermedades. Para ello, se analizó el patrón de expresión de dos marcadores celulares relacionados con los principales tipos neuronales afectados en las SCAs. En concreto se estudió la expresión de la proteína de unión a calcio calbindina, ampliamente utilizada como marcador de las células de Purkinje y que se ha visto disminuye en este tipo celular en la degeneración cerebelosa (Ishikawa et al., 1995). También se estudió la expresión de la enolasa específica de neuronas (NSE, del inglés *neuron-specific enolase*), una enzima citoplasmática que se encuentra en algunos tipos de neuronas, entre ellas las neuronas del núcleo dentado (Nogami et al., 1998), y que ha sido utilizada para estudiar el grado de degeneración neuronal en otras enfermedades que afectan al cerebelo (Koeppen et al., 2011, 2013). En paralelo a estudiar la degeneración neuronal en las muestras de pacientes de SCA también se investigó la existencia de procesos de microgliosis y astrogliosis, con los marcadores Iba1-1 y GFAP respectivamente, algo que se ha observado que ocurre en la mayoría de las SCAs (Rüb et al., 2013).

1.1.1. Estudio de la degeneración neuronal

Tal y como esperábamos a partir de la información proporcionada por el biobanco, hemos detectado profundos signos de degeneración en las muestras de cerebelo procedentes de pacientes de SCA en comparación con las muestras procedentes de individuos control. Por un lado, los análisis de inmunohistoquímica para calbindina confirmaron una notable pérdida de células de Purkinje en el cerebelo de los pacientes de SCA comparado con los casos control (Figura 1 A, B). Además, la inmunotinción con calbindina permitió identificar alteraciones morfológicas en las células de Purkinje que aún sobreviven en los enfermos de SCA (Figura 1 B.I, B.II). Dichas alteraciones morfológicas incluyen un cuerpo celular encogido, reducción en el tamaño de su árbol dendrítico, deformaciones del cono axónico (torpedos axonales) y la aparición de cestas vacías o *empty baskets*, que corresponden a terminaciones dendríticas en torno a las células de Purkinje ya desaparecidas, algo que ya ha sido descrito previamente que ocurre en estas enfermedades (Ishikawa et al., 1995; Koeppen, 2005; Seidel et al., 2012). Estas alteraciones en las células de Purkinje sólo aparecían en los cerebelos procedentes de enfermos de algún tipo de SCA. En estos casos se pudo apreciar células que están en diferentes fases de degeneración mostrando una pérdida variable de calbindina, aparentemente en gradiente, con células de Purkinje que sobreviven y que presentaban una fuerte inmunotinción a calbindina hasta en otras en las que había una importante reducción de este marcador (Figura 1 B.II-E). Estos análisis mostraron una relación directa entre la pérdida de la proteína calbindina por parte de las células de Purkinje y la degeneración celular, datos que concuerdan con estudios previos realizados también en muestras de tejido de pacientes con diferentes tipos de SCAs (Ishikawa et al., 1995). Las células de Purkinje supervivientes a menudo se encuentran rodeadas por gránulos positivos para calbindina (Figura 1 C y D), de forma similar a lo que se ha descrito en otras SCAs (Seidel et al., 2012).

Además de una pérdida de células de Purkinje también se observó una reducción en el número de neuronas en el núcleo dentado del cerebelo de los pacientes de SCA, según muestra la inmunohistoquímica para la NSE que se utilizó como marcador de este tipo de neuronas (Figura 2). Esta pérdida de células en el núcleo dentado ya se había observado previamente en muestras *post mortem* de individuos afectados por la SCA3, la SCA7 y la SCA17 (Koeppen, 2005; Koeppen et al., 2013).

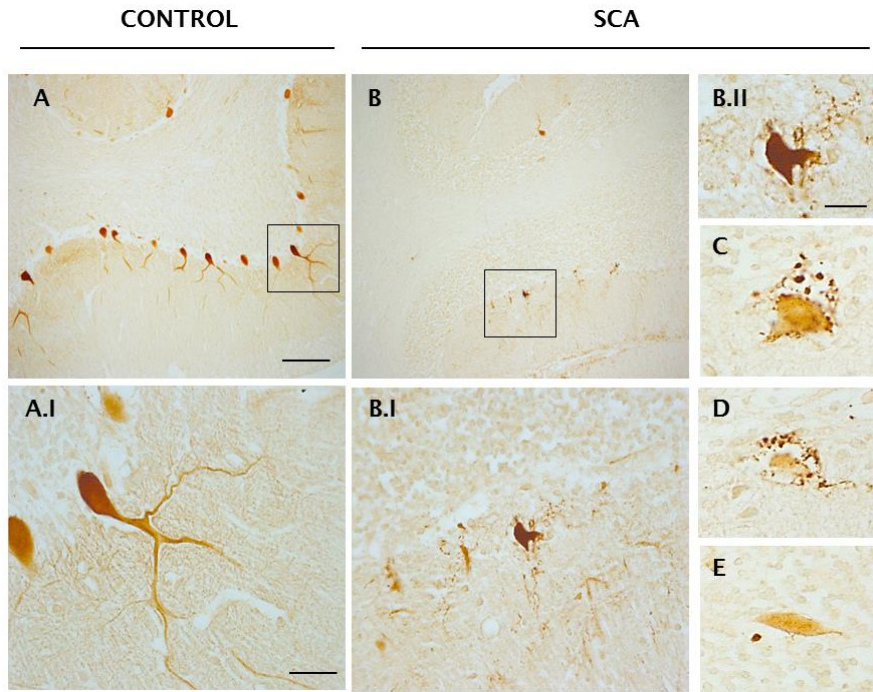


Figura 1. Inmunohistoquímica para el marcador neuronal calbindina. La expresión del marcador de células de Purkinje calbindina se observa en el cerebelo de individuos control (A) y enfermos de SCA (B). En los afectados de SCA las células de Purkinje que sobreviven presentan diferentes grados de degeneración (B.II-E). Escala de las barras: A, B, 200µm; detalles en A.I y B.I, 50µm; B.II-E, 20µm.

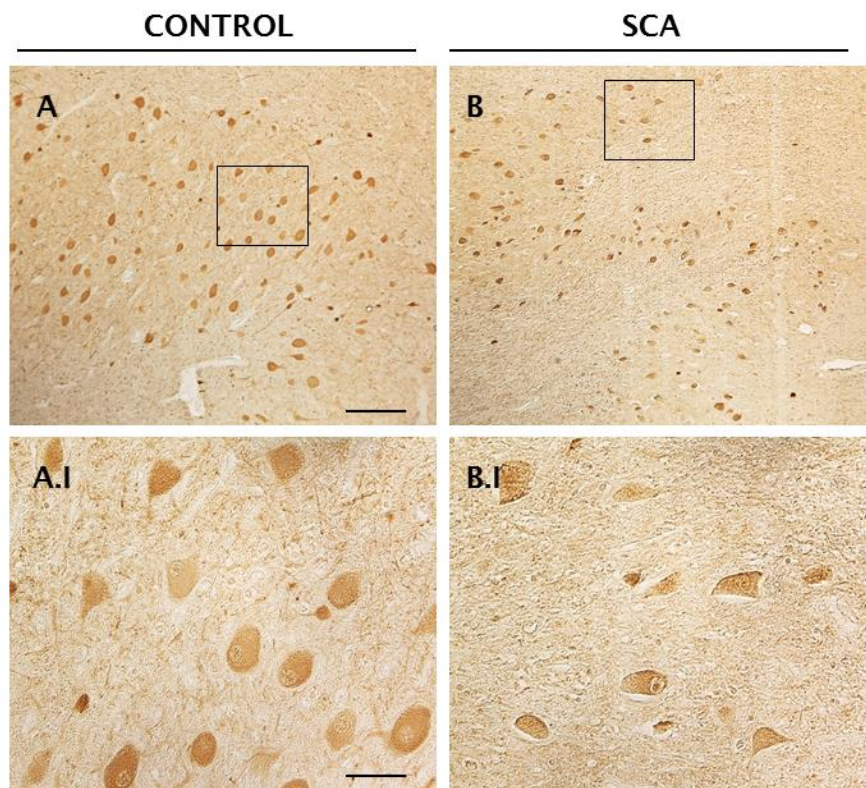


Figura 2. Inmunohistoquímica para el marcador neuronal NSE. La proteína NSE se expresa en el núcleo dentado de individuos control (A) y enfermos de SCA (B). Escala de las barras: A, B, 400µm; detalle en A.I y B.I 100µm.

1.1.2. Estudio de la respuesta glial

A pesar de que el papel de las células gliales en la patogénesis de las SCAs no está del todo definido, los estudios previos en el cerebelo de pacientes con esta patología mostraban que, a menudo, la degeneración neuronal iba acompañada de procesos de gliosis (Rüb et al., 2013). También en nuestro caso, la expresión de Iba-1 demostraba un incremento en las células de microglía en áreas de sustancia blanca y sustancia gris del cerebelo de enfermos de SCA. Esta activación microglial fue particularmente evidente en la capa granular de la corteza cerebelosa (Figura 3 A, B), así como en la sustancia blanca de las folias (Figura 3 C, D) así como la que rodea al núcleo dentado (Figura 3 E, F). La microglía identificada en los cerebelos de pacientes de SCA presentaba una morfología típica de la microglía reactiva con una reducción en sus procesos e incremento en el tamaño de su cuerpo celular (Figura 3 B.I, D.I). Se observó también la presencia de infiltrados perivasculares de microglía en la sustancia blanca de los pacientes de SCA (Figura 3 F.I).

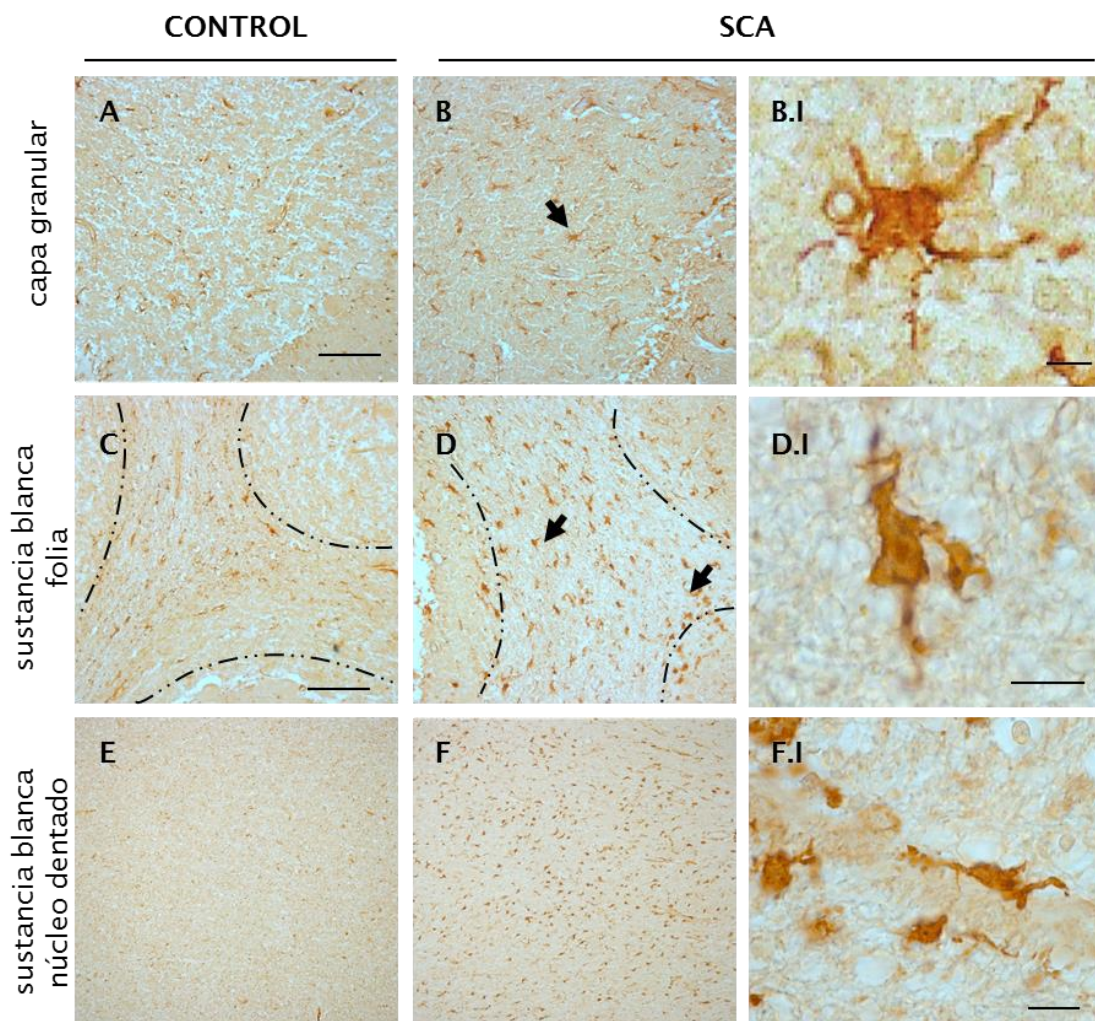


Figura 3. Inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba-1. Se observa expresión del marcador microglial Iba-1 en el cerebelo de sujetos control (A, C, E) y enfermos de SCA (B, D, F): corteza cerebelosa (A, B), en la sustancia blanca subcortical (C, D; región delimitada por líneas) y sustancia blanca próxima al núcleo dentado (E, F). Detalle de microglía reactiva (flechas, en B, detalles en B.I, D.I) y perivascular (F.I). Escala de las barras: A-D, 100µm; E-F, 100µm; detalles en B.I, D.I y F.I 10µm.

Respecto a la astrogliosis, en el cerebelo de los pacientes de SCA también se observó un incremento en la expresión de GFAP, que es un marcador de astrocitos, con respecto a los individuos control, lo que significa que hay una importante astrogliosis. Esta activación astrogliosis se observó en áreas de sustancia blanca, tanto en la de las folias cerebelosas como en la que rodea el núcleo dentado (Figura 4). En la sustancia blanca el marcaje se localizaba de forma preferente en la superficie externa de los vasos sanguíneos (Figura 4 B.I y D.I).

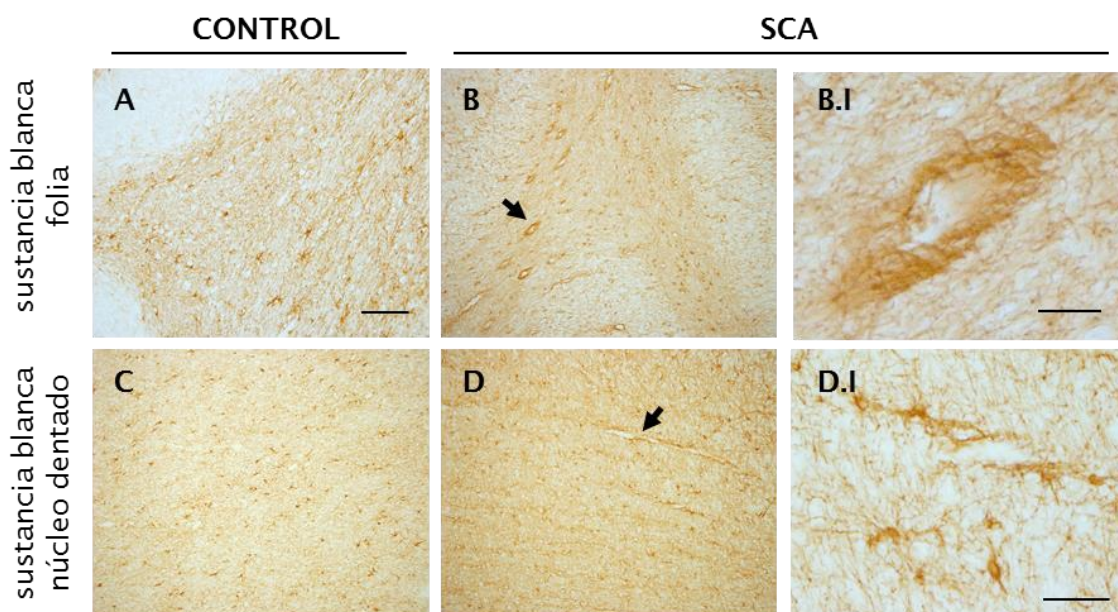


Figura 4. Inmunohistoquímica para el marcador de astrocitos GFAP en la sustancia blanca del cerebelo. Se observa inmunotinción para el marcador de astrocitos GFAP en la sustancia blanca del cerebelo de individuos control (A, C) y enfermos de SCA (B, D): sustancia blanca de las folias cerebelosas (A, B) y en la sustancia blanca que rodea el núcleo dentado (C, D). Este marcaje aparece de forma preferente en las paredes de los vasos sanguíneos (B.I y D.I). Escala de las barras: A-B, 100µm; C-D, 200µm; detalles en B.I y D.I 20µm.

Además de en la sustancia blanca, se observó un marcado incremento de la expresión de GFAP en la corteza cerebelosa de los pacientes con SCA respecto de los controles (Figura 5 A, B). Este incremento fue evidente tanto en la capa granular (Figura 5 C, D) como en la capa molecular y la capa de células de Purkinje (Figura 5 E, F). En la capa granular, el marcaje para GFAP se localizó en astrocitos protoplásmicos dispersos (Figura 5 D.I). En la capa molecular el marcaje correspondió a los procesos de la glía de Bergmann, un astrocito característico de la corteza del cerebelo, que se caracteriza por un cuerpo celular pequeño localizado muy próximo al soma de las células de Purkinje y unas prolongaciones que se proyectan hacia la capa molecular (Figura 5 F.I). El incremento observado en los cerebelos procedentes de enfermos de ataxia fue tanto en el número de células gliales como en el número de procesos. Este incremento en la glía de Bergmann, se ha descrito previamente en cerebelos de pacientes que habían padecido algunos de los tipos de ataxias dominantes como la SCA2, la SCA3 o la SCA17 (Bruni et al., 2004; Fujigasaki et al., 2001; Scherzed et al., 2012).

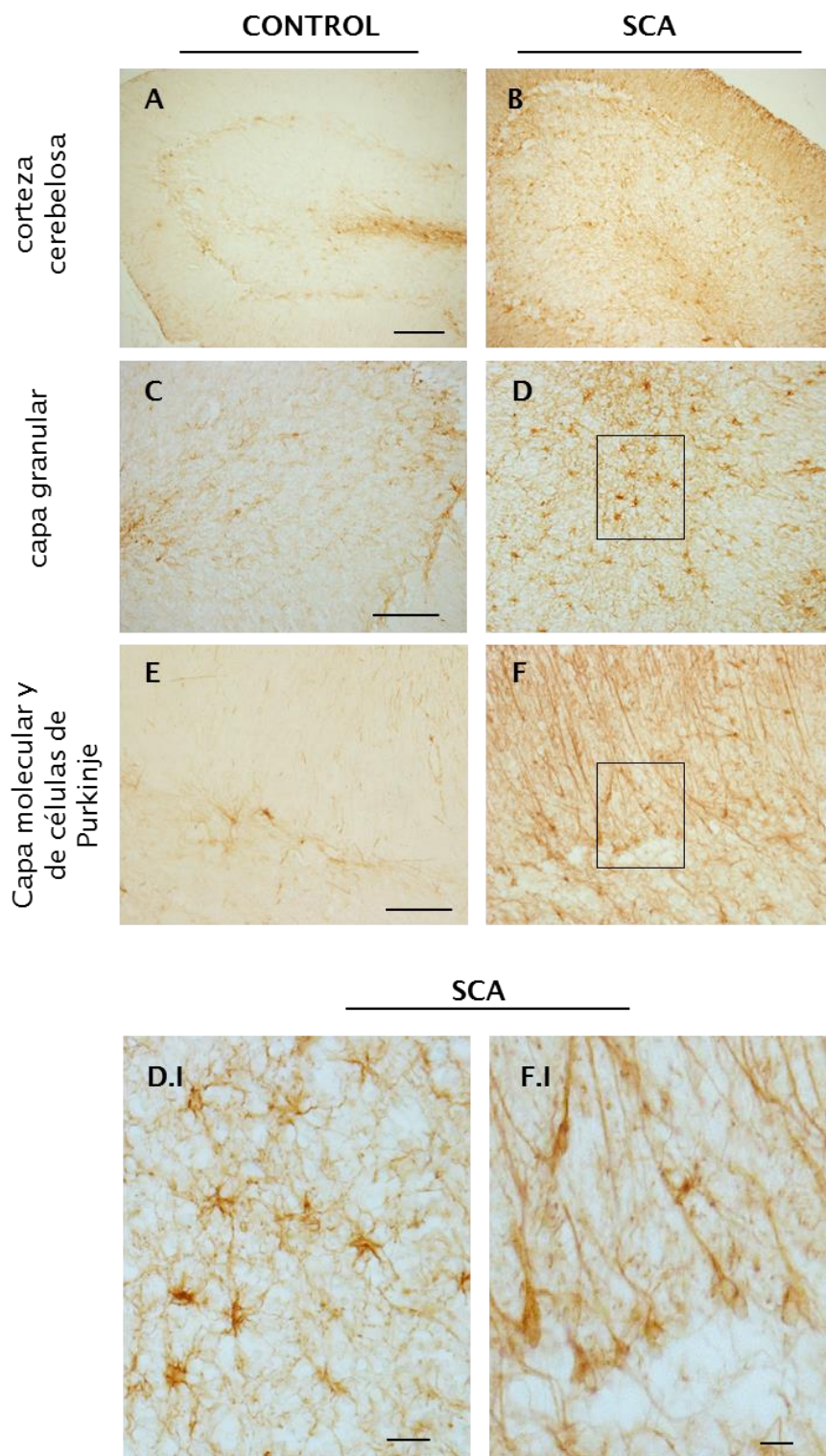


Figura 5. Inmunohistoquímica para el marcador de astrocitos GFAP en la corteza cerebelosa. Se observa un aumento de expresión del marcador de astrocitos GFAP en la corteza cerebelosa de los enfermos de SCA (B), en comparación con los controles (A): capa granular (C, D), capa molecular y capa de células de Purkinje (E, F). Detalle de astrocitos protoplásmicos en la capa granular (D.I) y glía de Bergmann (F.II) en la capa de células de Purkinje de los individuos afectados de SCA. Escala de las barras: A, B 200µm; C, D 100µm; detalles en D.I 20µm; F.I 10µm.

1.2. ANÁLISIS DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN EL CEREBELO DE LOS PACIENTES DE SCA

Una vez confirmadas las alteraciones neuropatológicas (perdida neuronal, activación glial) en el cerebelo de pacientes con SCAs, nos propusimos analizar los cambios en diferentes proteínas del sistema endocannabinoide. Nuestros resultados mostraron claras diferencias en el patrón de expresión de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ así como en el de las enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL en el cerebelo de los pacientes de SCA al compararlos con los controles. Este incremento se observó en áreas de sustancia gris, en la corteza cerebelosa (capa granular y capa de células de Purkinje) y en las células del núcleo dentado. También se observó aumento en la expresión de varios elementos del sistema cannabinoide endógeno en la sustancia blanca, tanto en la zona subcortical como en la que rodea al núcleo dentado.

1.2.1. Estudio del patrón de distribución del receptor CB₁

Como se ha mencionado anteriormente, el cerebelo es una de las estructuras del SNC donde el receptor CB₁ se expresa más abundantemente, especialmente en la corteza cerebelosa (Herkenham et al., 1991a, 1991b; Tsou et al., 1998). En los individuos control se observa marcaje para este receptor en la zona basal de las células de Purkinje, las conocidas formaciones tipo pincel, lo que indica que el receptor CB₁ está localizado en los axones de las células en cesto que sinaptan con el soma de las células de Purkinje (Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998). En todas las muestras analizadas, que procedían de pacientes con diferentes tipos de SCAs, se observó un incremento en la intensidad de marcaje para el receptor CB₁ en estas formaciones con respecto a los controles. Además, en las muestras de los pacientes de SCA, el cuerpo celular de las células de Purkinje se marcaba moderadamente, algo que no se observó en los individuos control (Figura 6 A, B). El análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas con la inmunotinción para el receptor CB₁ en la corteza cerebelosa permitió confirmar el incremento significativo de este receptor en las células de Purkinje en los pacientes de SCA en comparación con los controles. Este aumento en la inmunorreactividad para el receptor CB₁ era común a todos los pacientes, independientemente del tipo de SCA al que pertenezcan (Figura 6 C).

Mediante estudios de doble inmunofluorescencia con calbindina se confirmó la presencia del receptor CB₁ en el soma de las células de Purkinje de los enfermos de SCA, como puede apreciarse claramente en las imágenes de secciones confocales únicas (Figura 7 A-H) y en el plano ortogonal (Figura 7 I), algo que ya había sido descrito previamente por otros autores en cerebelo de rata (Moldrich y Wenger, 2000). Nuestros datos muestran que el incremento en la expresión del receptor CB₁ parece ser más evidente en aquellas células que presentan una baja expresión de calbindina (células degeneradas) siendo baja la expresión del receptor CB₁ en aquellas células con alto contenido en esta proteína (células poco degeneradas) (Figura 7 J), lo que significaría que: (i) la presencia del receptor CB₁ en las células de Purkinje podría servir de marcador de neurodegeneración; y (ii) aunque los niveles del receptor CB₁ incrementarían en

cada célula, los niveles globales para este receptor en las SCAs irían progresivamente disminuyendo en paralelo a la pérdida de neuronas de Purkinje.

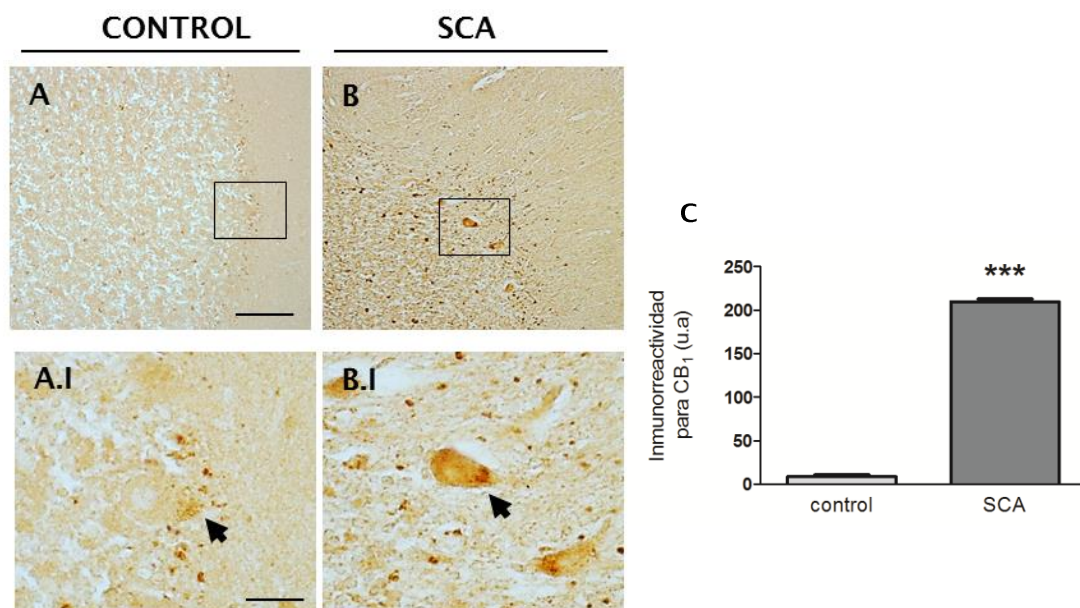


Figura 6. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en las células de Purkinje. Se observa expresión del receptor CB₁ en la capa de células de Purkinje de los casos control (A) y afectados de SCA (B). Esta expresión aparece en las formaciones tipo pincel (flecha en A.I y B.I) y en el caso de los individuos afectados de SCA también en el soma de las células de Purkinje (B.II). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, ***p<0.001 vs control. Escala de las barras: A, B 200µm; A.I, B.I 25µm.

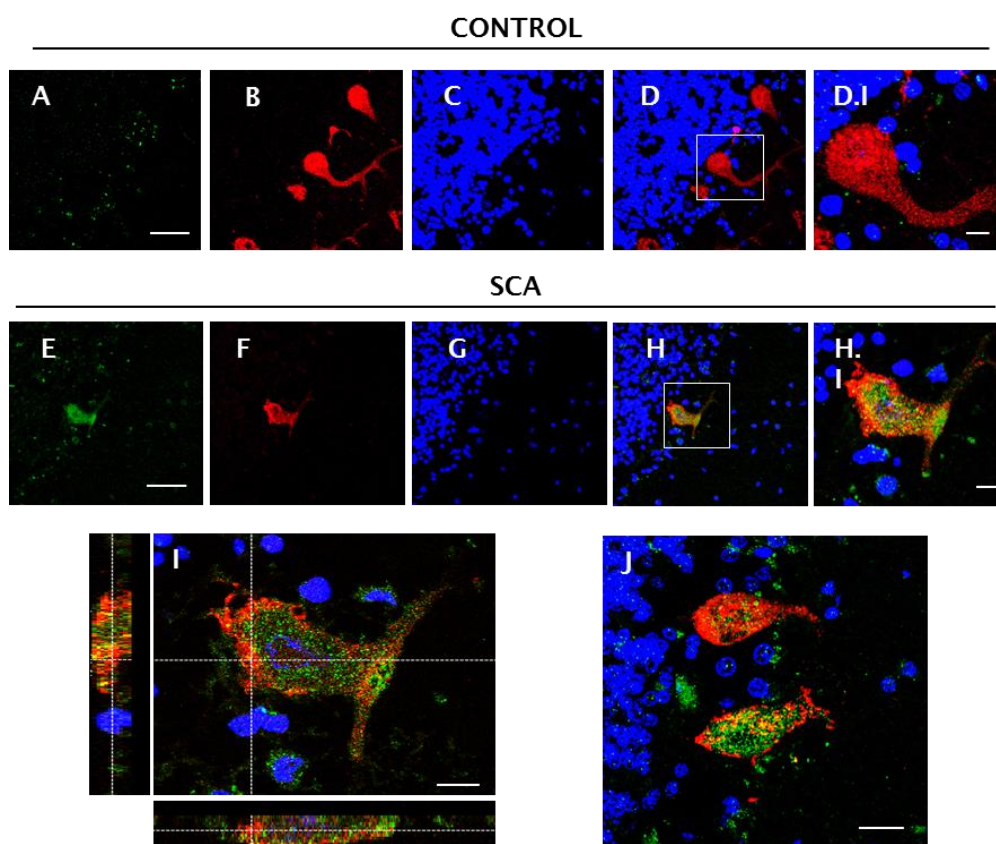


Figura 7. Doble inmunofluorescencia para el receptor CB₁ y calbindina en las células de Purkinje. Se demuestra la presencia de este receptor en las células de Purkinje de los casos de SCA (E-H), detalle en H.I: receptor CB₁ (en verde) y calbindina (en rojo) con tinción de núcleos (en azul). La reconstrucción ortogonal confirma la colocación de CB₁ con calbindina, marcador de células de Purkinje (I). El incremento de CB se observa principalmente en las células de Purkinje que presentan poca proteína calbindina (J). Escala de las barras: A-H 50µm, D.I, H.I, I y J 10µm.

En los cerebelos procedentes de enfermos de SCA se observó también una fuerte inmunotinción para el receptor CB_1 en las otras neuronas que degeneran en la enfermedad, las neuronas del núcleo dentado (Figura 8 B). En los casos control, sin embargo, el marcaje en estas células es más moderado (Figura 8 A) como ya habían visto otros autores (Suárez et al., 2008). La cuantificación de la densidad de marcaje para el receptor CB_1 confirmó que los niveles de marcaje para este receptor eran más altos en este tipo de neuronas en los pacientes de SCA (Figura 8 C). Este aumento en la expresión del receptor CB_1 es común a todos los casos independientemente del tipo de SCA. Puede parecer que se trata de una situación singular, ya que lo normal en las enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y otras) es que los niveles del receptor CB_1 disminuyen en paralelo a la pérdida neuronal dada su presencia en las neuronas que degeneran en estas enfermedades. Sin embargo, es importante destacar que también se ha observado un incremento en la expresión del receptor CB_1 en neuronas en algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Van Laere et al., 2012; Lastres-Becker et al., 2001) aunque, en este caso, el receptor CB_1 no estaría localizado en las neuronas que degeneran en esta enfermedad. Puede decirse, por tanto, que el caso de las SCAs es la primera vez que se observa un incremento del receptor en las células que directamente degeneran en la enfermedad.

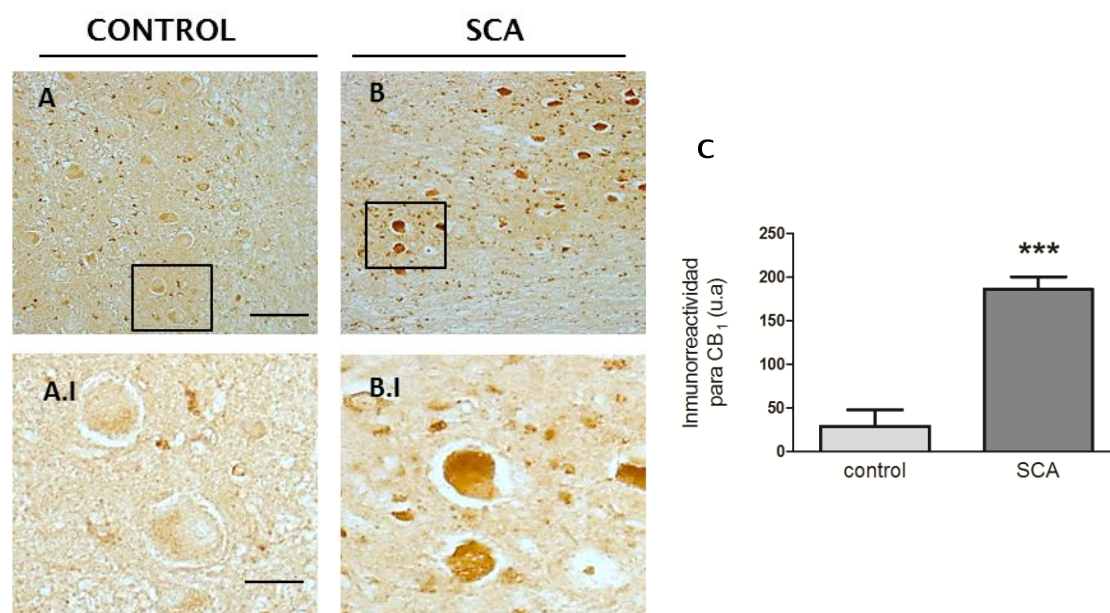


Figura 8. Inmunohistoquímica para el receptor CB_1 en las células del núcleo dentado. Se observa presencia del receptor CB_1 en las células del núcleo dentado del cerebelo de enfermos de SCA (B) en comparación con los controles (A), detalles en A.I, B.I. En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, *** $p < 0.001$ vs control. Escala de las barras: A, B 200 μ m; A.I, B.I 25 μ m.

En la corteza cerebelosa, además de en las células de Purkinje, nuestros estudios muestran una fuerte inmunotinción para el receptor CB_1 en la capa granular de los pacientes de SCA en comparación con los sujetos control (Figura 9 A, B). La cuantificación de la densidad de marcaje para el receptor CB_1 en esta estructura confirmó un aumento de expresión para este receptor en todos los pacientes de SCA, independientemente del tipo de ataxia al que correspondan (Figura 9 C).

De nuevo, para definir los tipos celulares específicos que expresan receptores CB_1 se llevaron a cabo experimentos de doble marcaje. Para tal fin, se emplearon, en cada caso frente al receptor CB_1 , dos marcadores fenotípicos bien conocidos: la proteína de unión a la molécula adaptadora de unión a calcio Iba-1 (un marcador de microglia) y la proteína ácida fibrilar glial GFAP (un marcador de astrocitos). Los resultados mostraron que la inmunotinción para el receptor CB_1 colocaliza con la señal que detectan ambos anticuerpos lo cual indica que las células que expresan el receptor CB_1 en la capa granular del cerebelo de los pacientes de SCA son astrocitos y microglia (Figura 9 D-K). Varios estudios previos sugieren que la expresión del receptor CB_1 en estas células podría ser parte de mecanismos de protección endógena que se activan en respuesta al daño y que tendrían como finalidad preservar las neuronas de la muerte en estas áreas cerebrales (García-Ovejero et al., 2009; Waksman et al., 1999).

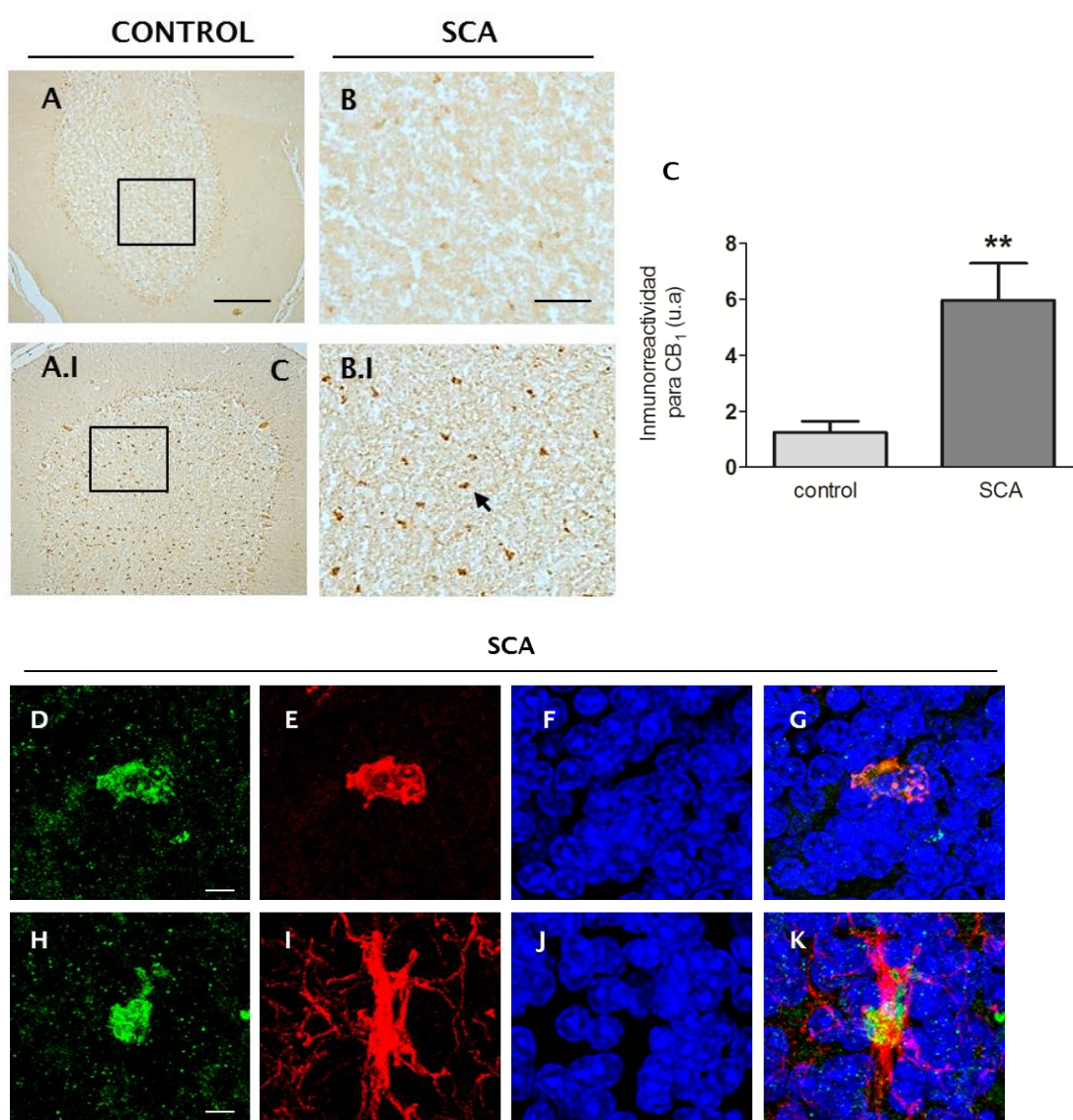


Figura 9. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para el receptor CB_1 en la capa granular. Se detecta presencia para el receptor CB_1 en la capa granular del cerebelo de los enfermos de SCA (B) en comparación con los controles (A). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, $**p < 0.01$ vs control. Se identificaron las células responsables de ese marcaje en la capa granular (flechas en B.I) como células de microglia y astrocitos. En los paneles D-K se muestran los experimentos de doble inmunofluorescencia para el receptor CB_1 (en verde) y los marcadores gliales (en rojo): Iba-1 (F) y GFAP (J). En azul se marcan los núcleos y en los paneles G y K la colocalización de los tres marcadores. Escala de las barras: A, B 200µm; A.I, B.I 50µm; D-K 20µm.

En cuanto a las áreas de sustancia blanca, nuestros resultados demostraron un moderado incremento en la expresión del receptor CB₁ tanto en la sustancia blanca subcortical (Figura 10 B) como en la que rodea el núcleo dentado (Figura 10 E) de los pacientes de SCA, marcaje que no aparece en las muestras de tejido de los individuos control (Figura 10 A, D). El análisis cuantitativo de las imágenes confirmó el aumento de expresión del receptor CB₁ en el cerebelo de los pacientes de SCA en ambas áreas de sustancia blanca (Figura 10 C, F). Las células CB₁ positivas en la sustancia blanca de las folias en los pacientes SCA mostraban una morfología similar a las células microgliales (Figura 10 B.II, E.II).

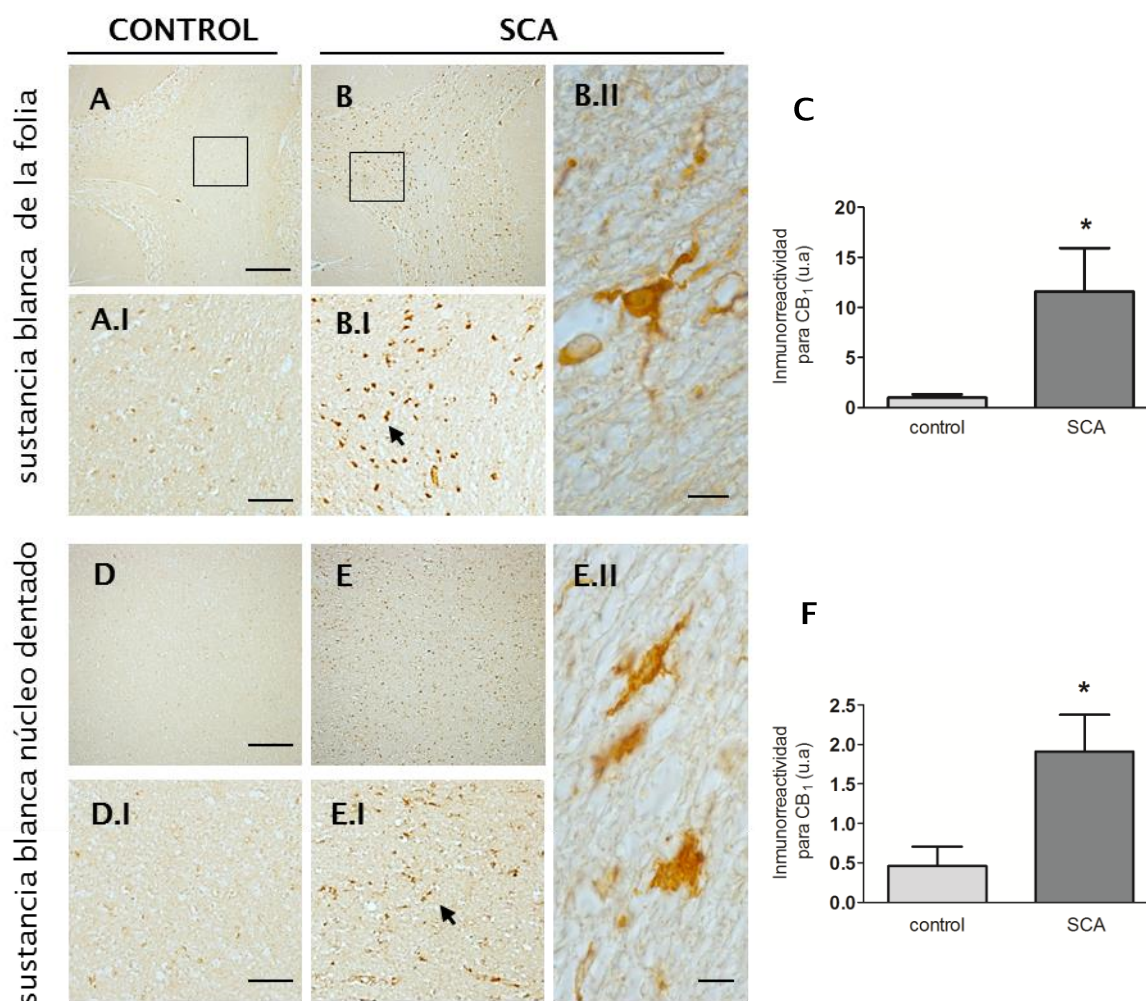


Figura 10. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en la sustancia blanca. Se observa inmunorreactividad para el marcador Iba-1 en la sustancia blanca el cerebelo de los enfermos de SCA (B, E) en relación a los controles (A, D): sustancia blanca de las folias cerebelosa (A, B) y sustancia blanca próxima al núcleo dentado (D, E). Detalle de células CB₁ positivas con morfología de células de glía (flechas, en B.I, E.I, detalles en B.II, E.II). En el panel C y F se muestran los análisis cuantitativos de las imágenes para la sustancia blanca subcortical (C) y la que rodea al núcleo dentado (F). Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, *p<0.05 vs control. Escala de las barras: A–D, 200µm; A.I–D.I, 100µm; detalles en B.II y E.II 10µm.

Con el fin de identificar el tipo celular de nuevo llevamos a cabo experimentos de doble marcaje en estas estructuras, utilizando marcadores específicos de células gliales como son el marcador de microglía Iba-1, el marcador de astrocitos GFAP y el antígeno marcador de macrófagos infiltrados CD68. Nuestros datos indicaron la presencia de receptores CB₁ en estos tres tipos celulares en la sustancia blanca del cerebelo de los enfermos de SCA (Figura 11). El

incremento en la expresión de CB₁ en estas células gliales también se ha descrito en el cerebro *post mortem* de pacientes afectados por otras patologías neurológicas como la esclerosis múltiple (Benito et al., 2007).

SCA

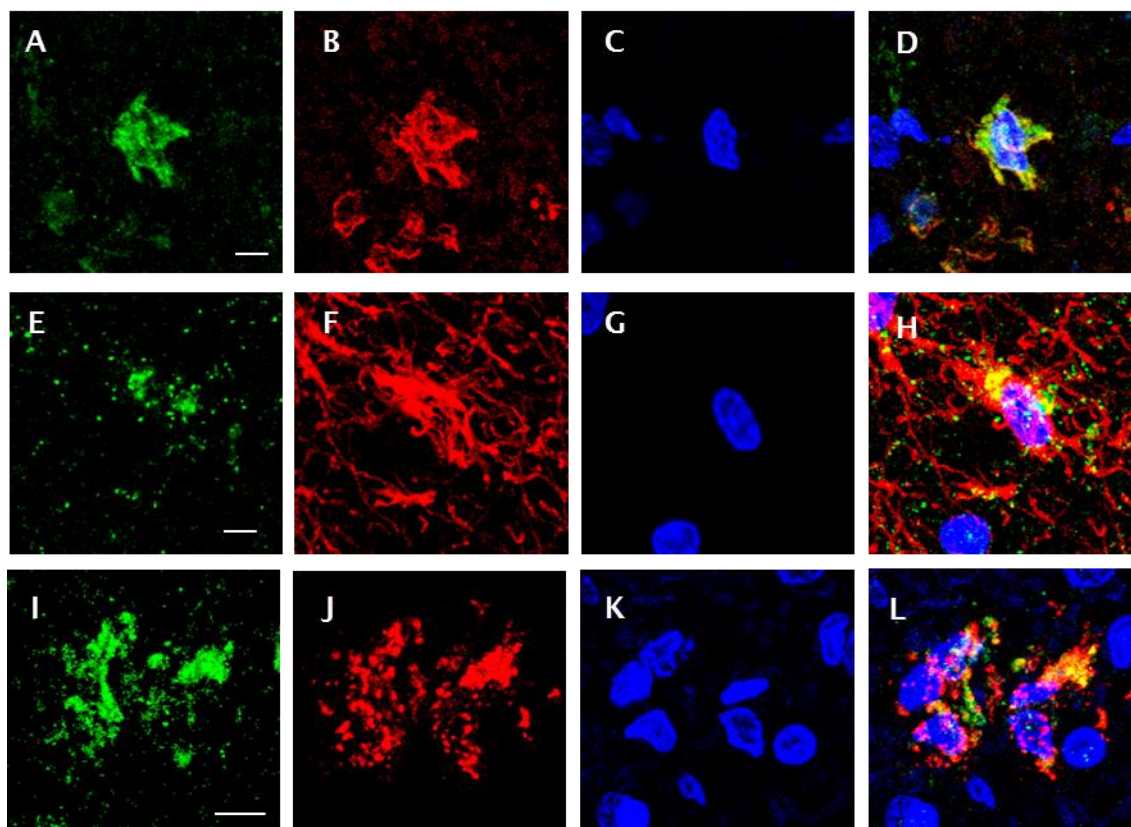


Figura 11. Doble inmunofluorescencia para el receptor CB₁ en la sustancia blanca. Se han identificado las células responsables del marcaje de CB₁ en la sustancia blanca capa como células de microglía (A–D), astrocitos (E–H) y macrófagos (I–L): receptor CB₁ (en verde) y los marcadores gliales (en rojo): Iba-1 (B), GFAP (F) y CD68 (J). En azul se marcan los núcleos y en los paneles D, H y L la colocalización de los tres marcadores. Escala de las barras: A–L 20µm.

1.2.2. Estudio del patrón de distribución del receptor CB₂

Como se ha comentado en la Introducción, la expresión del receptor CB₂ en el SNC está, en general, frecuentemente asociada a elementos gliales, en particular aquellos localizados en zonas lesionadas o bajo situaciones patológicas (Fernández-Ruiz et al., 2007). Esto parece ser que también ocurre en las SCAs aunque se observaron algunos elementos singulares en estas enfermedades. En el cerebelo de los individuos de SCA, se observó un nivel de marcaje para CB₂ de moderado a intenso en todas las regiones estudiadas, en comparación con la poca presencia de este receptor en el cerebelo de los individuos control tal y como se había publicado previamente (Núñez et al., 2004). Nuestros resultados mostraron la mayor presencia del receptor CB₂ en la capa granular de la corteza cerebelosa y en áreas de sustancia blanca. En los casos de SCA, la capa granular de la corteza cerebelosa presentaba una señal significativamente más fuerte para este receptor en comparación con los controles (Figura 12 A, B), según se pudo comprobar mediante el análisis de la densidad de marcaje (Figura 12 C). Los experimentos de doble inmunofluorescencia con el marcador Iba-1 nos permitieron localizar la expresión del

receptor CB_2 en la capa granular en las células de microglía (Figura 12 D-G). Esta presencia del receptor en las células microgliales ya se había observado previamente en otras patologías del sistema nervioso como son la enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003; Ramírez et al., 2005), la enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009), la enfermedad de Parkinson (Gómez-Gálvez et al., 2015) la esclerosis múltiple (Benito et al., 2007) y la esclerosis lateral amiotrófica (Yiangou et al., 2006).

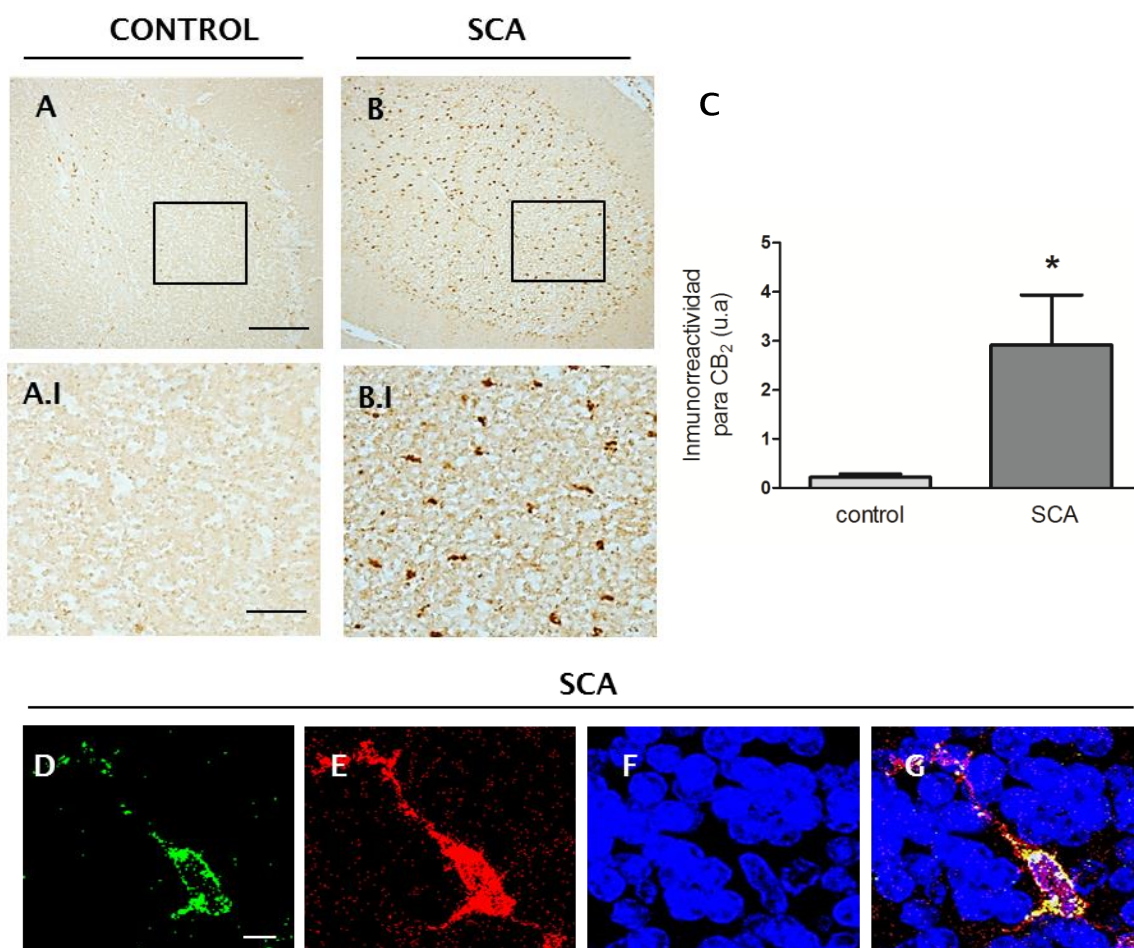


Figura 12. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para el receptor CB_2 en la capa granular de la corteza cerebelosa. Se confirma la presencia del receptor CB_2 en la capa granular del cerebelo de los enfermos de SCA (B) en comparación con los controles (A). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, * $p < 0.05$ vs control. Se ha identificado las células responsables de ese marcaje en la capa granular como células de microglía. En los paneles D-G se muestran los experimentos de doble inmunofluorescencia para el receptor CB_2 (en verde) y el marcador de Iba-1 (en rojo). En azul se marcan los núcleos y en el paneles G la colocación de los tres marcadores. Escala de las barras: A, B 200 μ m; A.I, B.I 50 μ m; D-K 20 μ m.

Sin embargo, los cambios más llamativos en la expresión del receptor CB_2 se detectaron en la sustancia blanca de las folias cerebelosas (Figura 13 A, B) y también en la sustancia blanca próxima al núcleo dentado (Figura 13 D, E). En ambas regiones se observa un incremento significativo para el receptor CB_2 en todos los casos de SCA, independientemente del tipo al que corresponden (Figura 13 C, F).

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados sobre muestras de cerebelo *post mortem* nos han mostrado también la expresión de CB_2 en las paredes de los vasos. Este marcaje

se observa tanto en los casos control (datos no mostrados), como ya se había descrito previamente (Núñez et al., 2004), como en los casos de SCA, siendo en estos últimos mucho más intensa la señal (Figura 13).

Los estudios de doble inmunofluorescencia en la sustancia blanca, nos revelaron la presencia del receptor CB₂ en microglía (colocalización con Iba-1) y astrocitos (colocalización con GFAP) (Figura 14), unos datos que se corresponden con lo descrito previamente en distintas regiones cerebrales de pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003), la enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009), la esclerosis múltiple (Benito et al., 2007), el síndrome de Down (Núñez et al., 2008) o más recientemente, la enfermedad de Parkinson (Gómez-Gálvez et al., 2015). En relación a las células positivas para el receptor CB₂ en las paredes de los vasos sanguíneos, nuestros análisis revelaron que se trata de astrocitos perivasculares (Figura 14 L, detalle en L.I).

En general siempre se ha creído que el receptor CB₂ se expresaba principalmente en el SNC en células gliales. Sin embargo, varios trabajos realizados a lo largo de los últimos 10 años han descrito la expresión de este receptor en algunas subpoblaciones neuronales del cerebelo, tronco encefálico y ganglios basales, entre otras (García et al., 2015; Lanciego et al., 2011; Van Sickle et al., 2005; Skaper et al., 1996). En nuestros análisis, además de la expresión del receptor CB₂ en las células de glía que se han mencionado anteriormente, también hemos observado marcaje para este receptor en neuronas. Por un lado, en los sujetos control, hemos visto señal en las formaciones tipo pincel situadas en torno al soma de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa y en las neuronas del núcleo dentado. Por otro lado, al igual que ocurría en el caso del receptor CB₁, el estudio inmunohistoquímico del receptor CB₂ en el cerebelo de los enfermos de SCA mostró un incremento significativo en la expresión de este receptor en las células de Purkinje que aún sobreviven en la enfermedad (Figura 15 A-C), un marcaje que aparece tanto a nivel de las formaciones tipo pincel como en el propio cuerpo celular de estas neuronas. La presencia del receptor CB₂ en el cuerpo celular de las células de Purkinje se confirmó mediante experimentos de doble inmunofluorescencia con el marcador calbindina (Figura 16 A-H) y mediante la obtención del plano ortogonal (Figura 16I). El hecho de que el receptor CB₂ se exprese en las neuronas que degeneran en la enfermedad se ha visto recientemente en otra enfermedad degenerativa como es la enfermedad de Parkinson, en la que se ha observado el receptor CB₂ en las neuronas dopaminérgicas nigroestriales en sujetos control disminuyendo significativamente en los pacientes de parkinson en paralelo a la pérdida de estas neuronas (García et al., 2015). En la capa de células de Purkinje se observó, además, un marcaje que, por su localización en forma de punteado, parece ser en la glía de Bergmann, un tipo de célula glial que se ha visto se encuentra activada en los pacientes de SCA (Robitaille et al., 1995). Esta expresión del receptor CB₂ aparece tanto en los tejidos de los individuos control como en los de los enfermos de SCA, siendo en estos últimos mucho más abundante e intenso (flechas rojas en Figura 15 A.I, B.I). Sin embargo, los intentos de colocalización con marcadores específicos para este tipo de células gliales (L1.NCAM, vimentina o GFAP) que se han realizado en estos estudios no han sido en ningún caso concluyentes (datos no mostrados).

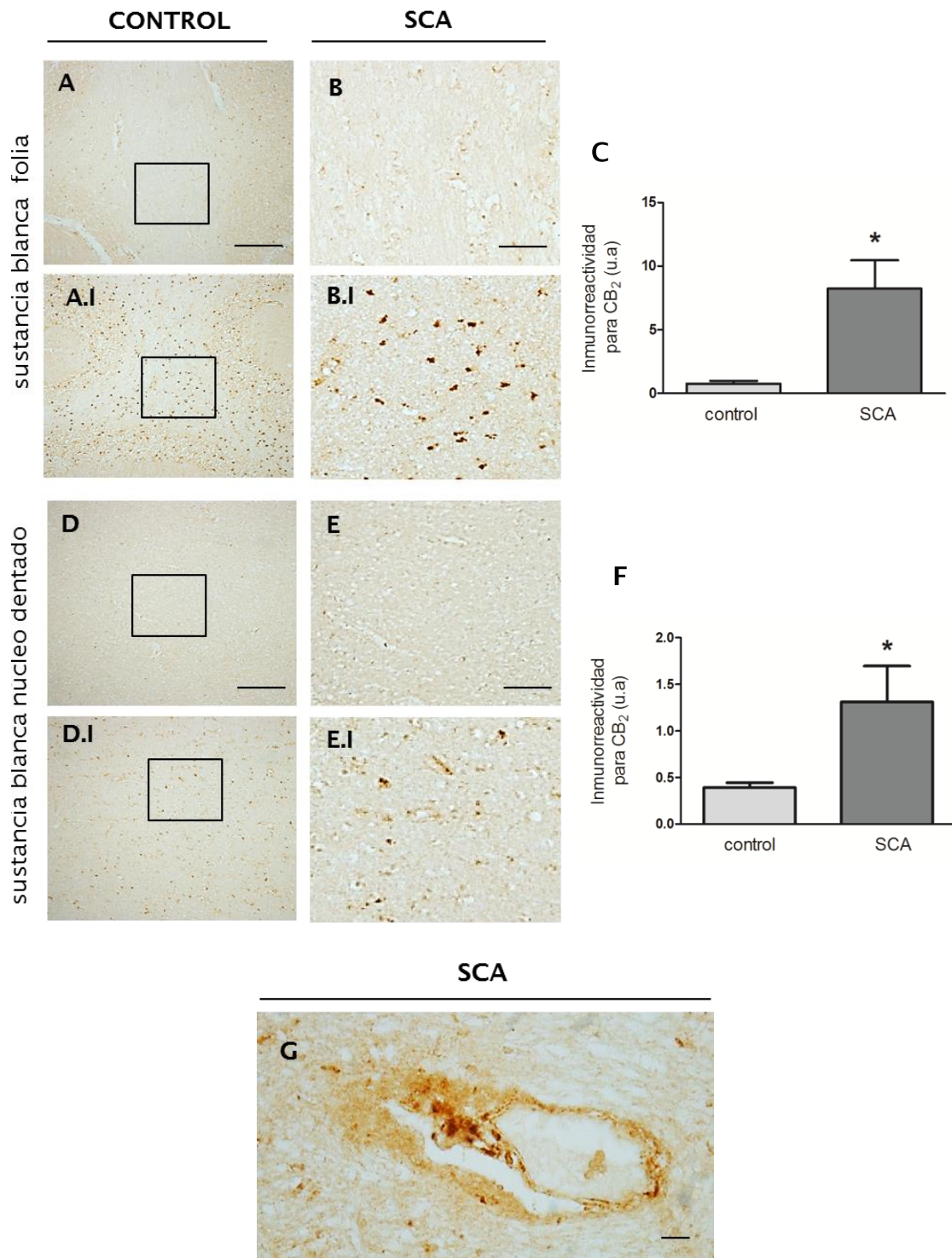


Figura 13. Inmunohistoquímica para el receptor CB₂ en la sustancia blanca. Se observa un aumento en la inmunorreactividad para CB₂ en la sustancia blanca del cerebelo de los enfermos de SCA (B, E) en relación a los controles (A, D): sustancia blanca de las folia cerebelosas (A, B) y sustancia blanca próxima al núcleo dentado (D, E). En el panel C y F se muestran los análisis cuantitativos de las imágenes para la sustancia blanca subcortical (C) y la que rodea al núcleo dentado (F). Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, *p<0.05 vs control. Detalle de marcaje perivascular para el receptor CB₂ en un paciente de SCA (G). Escala de las barras: A-D, 200µm; A.I-D.I, 50µm; G, 10µm.

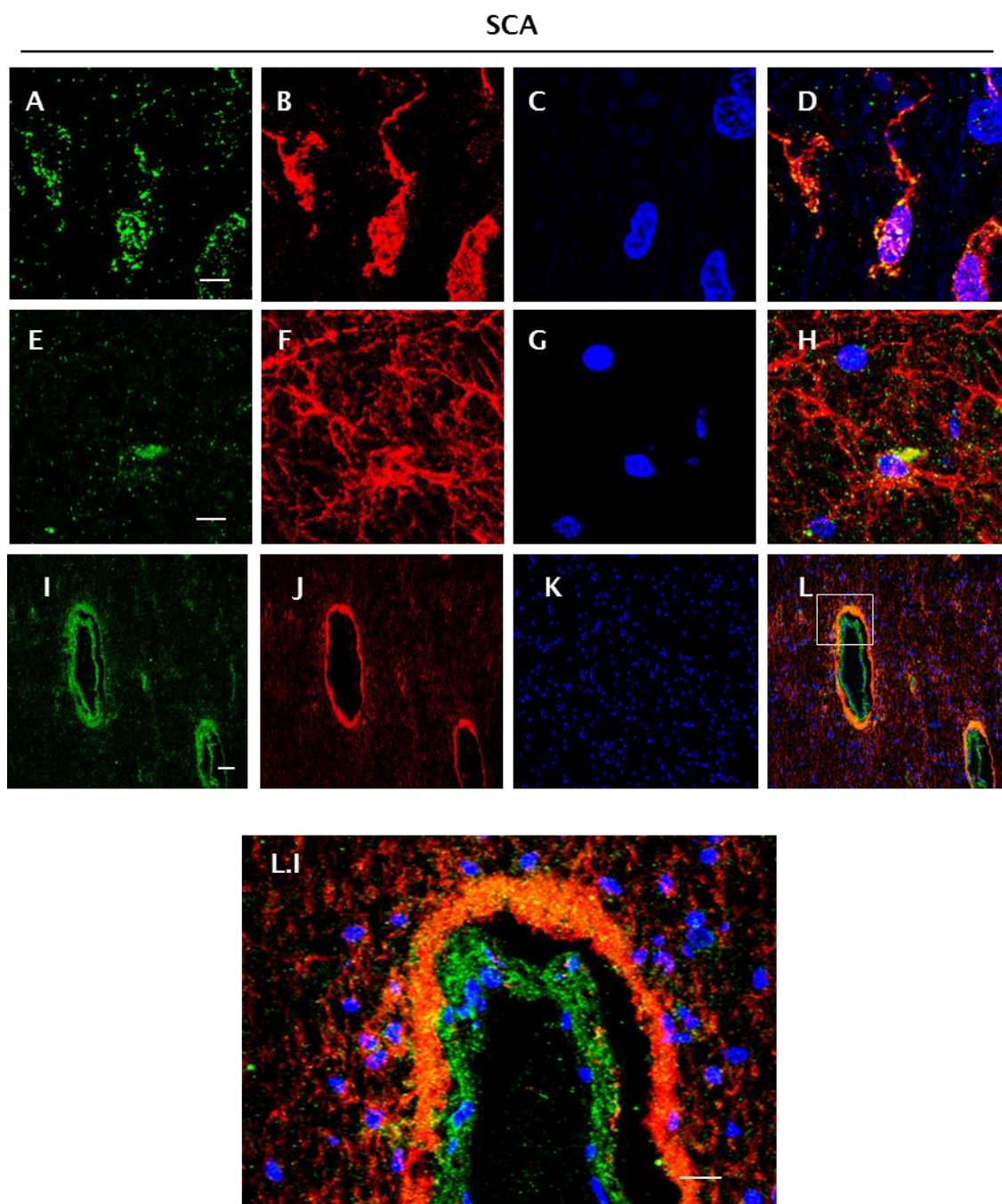


Figura 14. Doble inmunofluorescencia para el receptor CB₂ en la sustancia blanca del cerebelo. Se ha identificado las células responsables del marcaje de CB₂ en la sustancia blanca como células de microglía (A–D) y astrocitos (E–L). En los paneles se muestran los experimentos de doble inmunofluorescencia para el receptor CB₁ (en verde) y los marcadores gliales (en rojo): Iba-1 (B) y GFAP (F, J). En azul se marcan los núcleos y en los paneles D, H y L la colocalización de los tres marcadores. Nótese el marcaje perivascular de CB₂ en astrocitos (L, detalle en L.I) Escala de las barras: A–H 20µm; I–L 50µm; L.I 5µm.

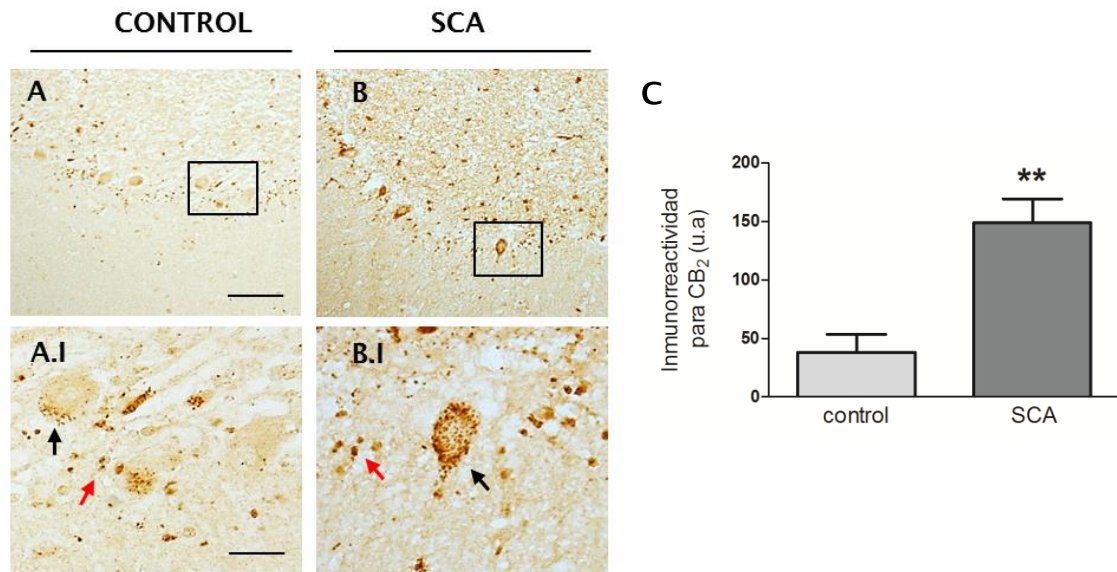


Figura 15. Inmunohistoquímica para el receptor CB₂ en la capa de células de Purkinje. Se observa presencia del receptor CB₂ en la capa de células de Purkinje de los casos de SCA (B) en comparación con los controles (A). Esta expresión se localiza en las formaciones tipo pincel (flecha negra en A.I, B.I.) y en el soma de las células de Purkinje. Además, se observa expresión para el receptor CB₂ en lo que parece ser la glía de Bergmann (flecha roja en A.I, B.I). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, **p<0.01 vs control. Escala de las barras: A, B 200µm; A.I, B.I 25µm.

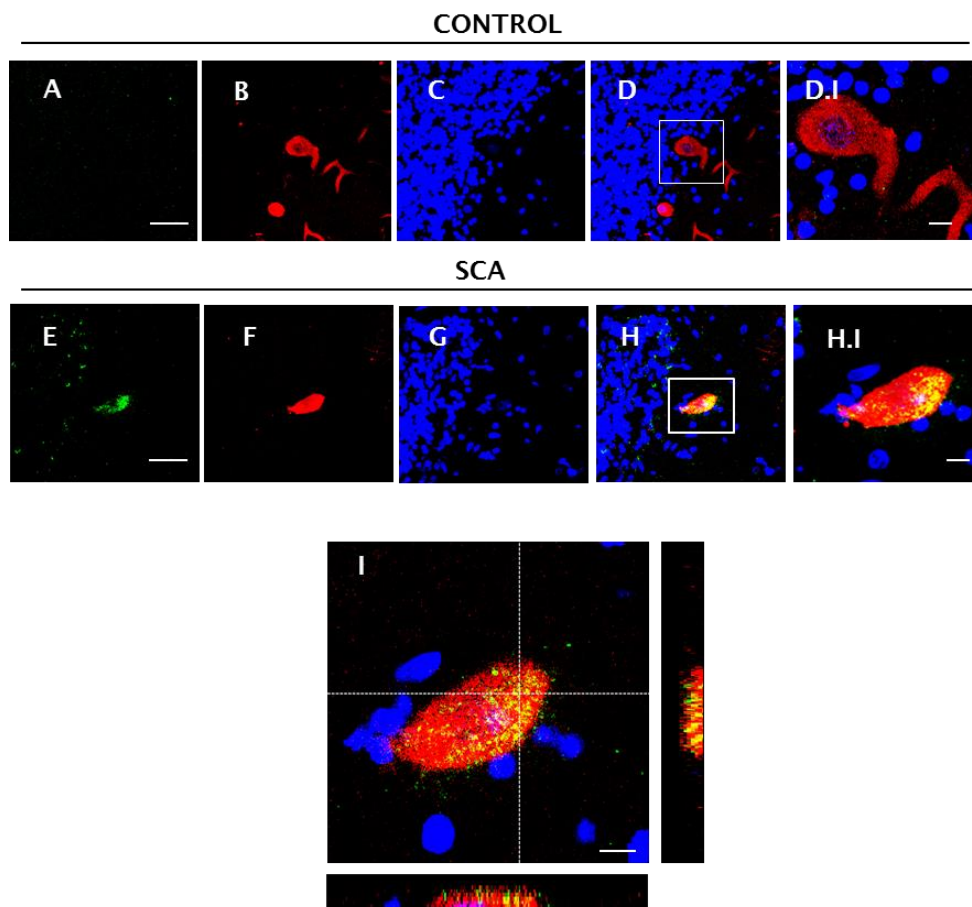


Figura 16. Doble inmunofluorescencia para el receptor CB₂ en las células de Purkinje. Se observa inmunorreactividad para el receptor CB₂ en las células de Purkinje de los casos de SCA (E-H), no así en los controles (A-D): receptor CB₂ (en verde) y calbindina (en rojo) con tinción de núcleos con Topro-3 (en azul). En los paneles D y H se muestra la colocalización de los tres marcadores, detalles en D.I y H.I., en el panel I se muestra la reconstrucción ortogonal para la colocalización de CB₂ con calbindina, marcador de células de Purkinje (I). Escala de las barras: A-H 50µm, D.I, H.I e I 10µm.

Como hemos mencionado anteriormente los experimentos de inmunohistoquímica también muestran presencia del receptor CB_2 en las neuronas del núcleo dentado tanto en el cerebelo de los individuos enfermos de SCA como en los controles (Figura 17 A, B). Este marcaje, que aparece en forma de punteado y localizado en un polo de la célula, ya se ha descrito previamente y corresponde a los terminales nerviosos de las fibras musgosas procedentes de varios núcleos cerebrales (Suárez et al., 2008). Nuestros datos revelan un incremento significativo del receptor CB_2 en estas terminaciones en todos los casos de SCA (Figura 17 A.I, B.I), confirmado mediante el análisis cuantitativo de las imágenes (Figura 17 C). Además, en estas células del núcleo dentado del cerebelo de los pacientes de SCA que expresan el receptor CB_2 , hemos observado degeneración grumosa, un tipo rasgo neuropatológico característico de estas enfermedades y que se asocia con la proliferación de terminales sinápticos patológicos (Koeppen, 2005; Koeppen et al., 2011, 2013) (Figura 17 A.II, B. II).

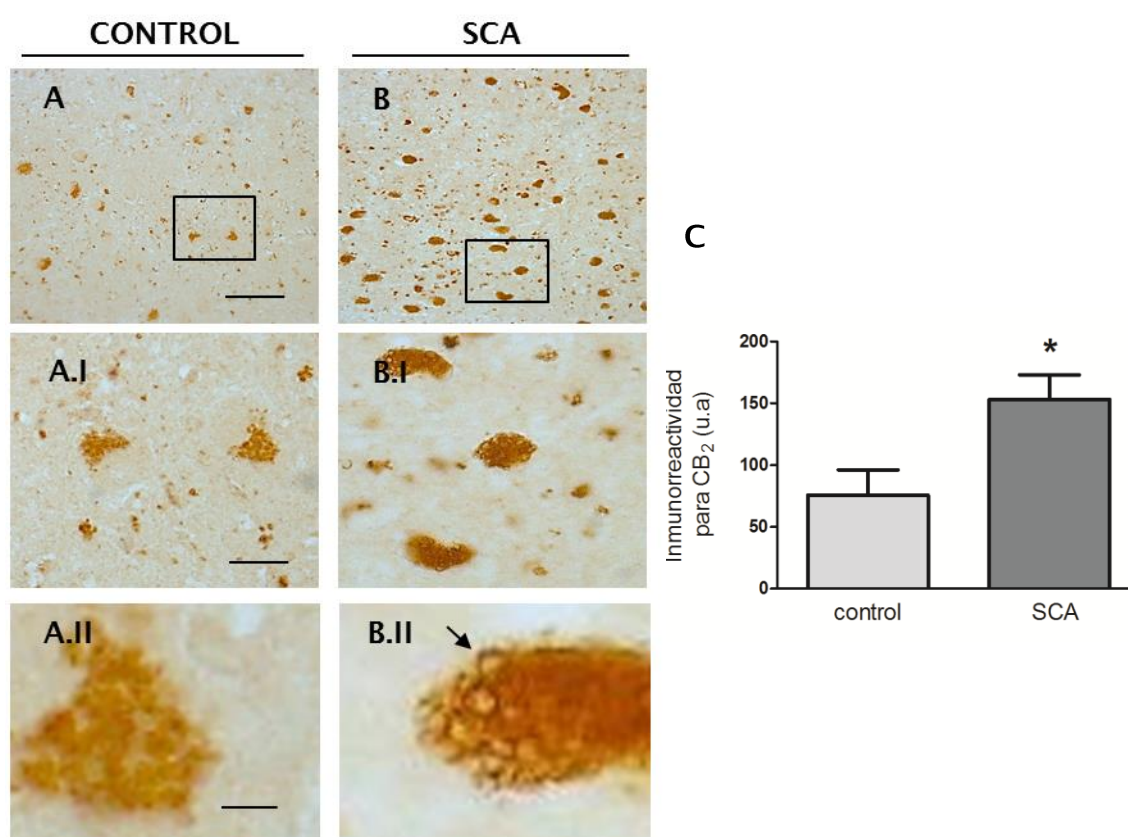


Figura 17. Inmunohistoquímica para el receptor CB_2 en las neuronas del núcleo dentado. Se observa inmunorreactividad para el receptor CB_2 en las células del núcleo dentado del cerebelo de individuos control (A) y enfermos de SCA (B), detalle en A.I, B.I. Nótese la diferencia entre los terminales de las fibras musgosas en los casos control (A.II) y la formación de vacuolas y degeneración grumosa en los casos de SCA (flecha en B.II). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, * $p < 0.05$ vs control. Escala de las barras: A, B 200 μ m; A.I, B.I 25 μ m; A.II, B.II 5 μ m.

1.2.3. Estudio del patrón de distribución de la enzima FAAH

Como en el caso de los receptores CB_1 y CB_2 , los niveles de FAAH también se incrementaron en el cerebelo de los individuos afectados por algún tipo de SCA con respecto a los controles. Este incremento de la enzima FAAH ya se había observado en otras patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple (Benito et al., 2003, 2007). En el cerebelo de sujetos control, se detectó señal para FAAH en las células de

Purkinje en cada sujeto, con un marcaje preferentemente perinuclear similar al obtenido en estudios previos (Figura 18 A, A,I) (Romero et al., 2002). Sin embargo, en los casos de SCA estudiados, se observó una inmunotinción que además de ser más intensa aparecía distribuida por todo el soma celular (Figura 18 B). Además, la cuantificación de la expresión de esta enzima en las células de Purkinje en cada sujeto demostró estar significativamente más elevada en todos los casos de SCA estudiados, independientemente del tipo de SCA que se tratara, siempre respecto a los sujetos control (Figura 18 C). La presencia de la enzima FAAH en las neuronas de Purkinje fue confirmada mediante colocalización con el marcador calbindina (Figura 18 D-K).

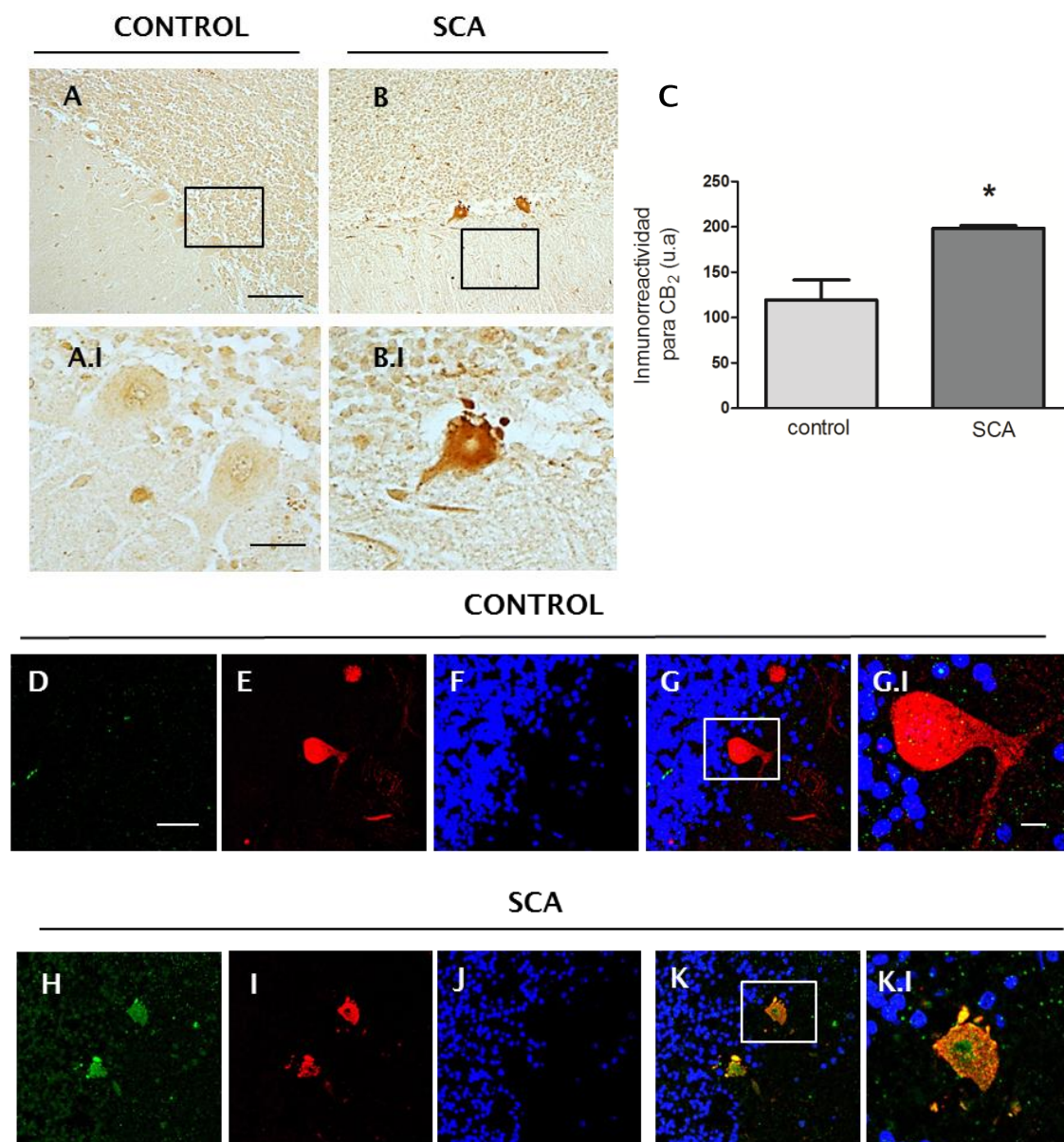


Figura 18. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para la enzima FAAH en las células de Purkinje. Se observa expresión de FAAH en las células de Purkinje de los casos control (A) y de enfermos de SCA (B). El análisis de las imágenes muestra diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (C). Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, * $p < 0.05$ vs control. Mediante doble inmunofluorescencia se confirma la presencia de la enzima FAAH distribuida de forma homogénea en el soma de las células de Purkinje de los casos de SCA, confirmado mediante la colocalización de la enzima FAAH (en verde) con el marcador calbindina (en rojo) y con el marcador de núcleos Topro-3 (en azul) (D-K) en los paneles G y K se muestra la colocalización de los tres marcadores. Escala de las barras: A, B 200 μ m; A.I, B.I 25 μ m; D-K 50 μ m; G.I, K.I 10 μ m.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la expresión de la enzima FAAH no experimentaba ningún cambio en las neuronas de núcleo dentado de los individuos afectados por SCA con respecto a los sujetos control. Además, a pesar de que estudios previos en muestras *post mortem* indicaban que estas células expresan una fuerte señal para FAAH (Romero et al., 2002), nuestros datos solo muestran una expresión muy leve en estas células (Figura 19 A, B).

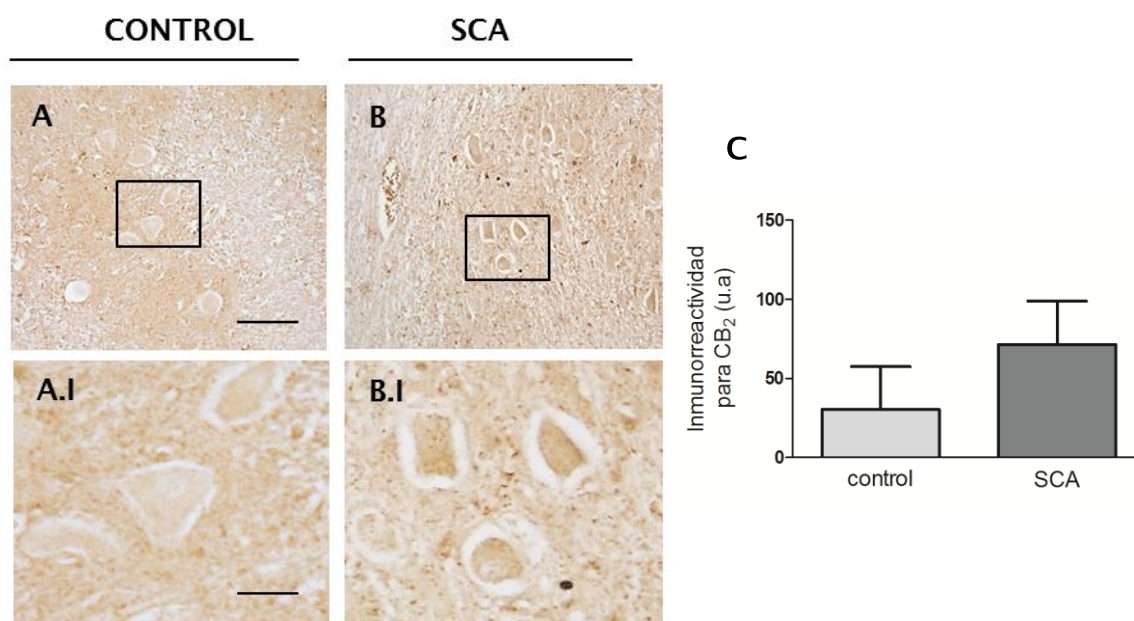


Figura 19. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en las células del núcleo dentado. Se observa una señal muy leve de FAAH en el núcleo dentado del cerebelo de individuos control (A) y enfermos de SCA (B), detalles en A.I, B.I. En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student. Escala de las barras: A, B 100µm; A.I, B.I 25µm.

Los cambios más significativos en cuanto a la expresión de FAAH en el cerebelo de enfermos de SCA se detectaron en la capa granular de la corteza cerebelosa (Figura 20 A-C). En concreto, se observó un incremento en la señal de FAAH en astrocitos, como se demostró por doble marcaje con GFAP y FAAH (Figura 20 D-G) (Benito et al., 2003; Núñez et al., 2008; Romero et al., 2002). Además de en la capa granular nuestros resultados mostraban un incremento en la inmunorreactividad para FAAH en la sustancia blanca de los enfermos de SCA (Figura 21 A-E).

Los experimentos de doble inmunofluorescencia nos permitieron identificar estas células como astrocitos activados (Figura 21 G-J). Esta señal es más fuerte en el cuerpo celular de los astrocitos que en los procesos y aparece de forma más evidente y abundante en la sustancia blanca subcortical que en la sustancia blanca que rodea a los núcleos profundos. Sin embargo, la cuantificación de las imágenes no muestra diferencias significativas con respecto a los casos control, en ninguna de las dos áreas de materia blanca estudiadas (Figura 21 C), probablemente porque los datos en el grupo de SCA fueron relativamente variables como demuestra el valor del error estándar de la media en las dos regiones (Figura 21 C).

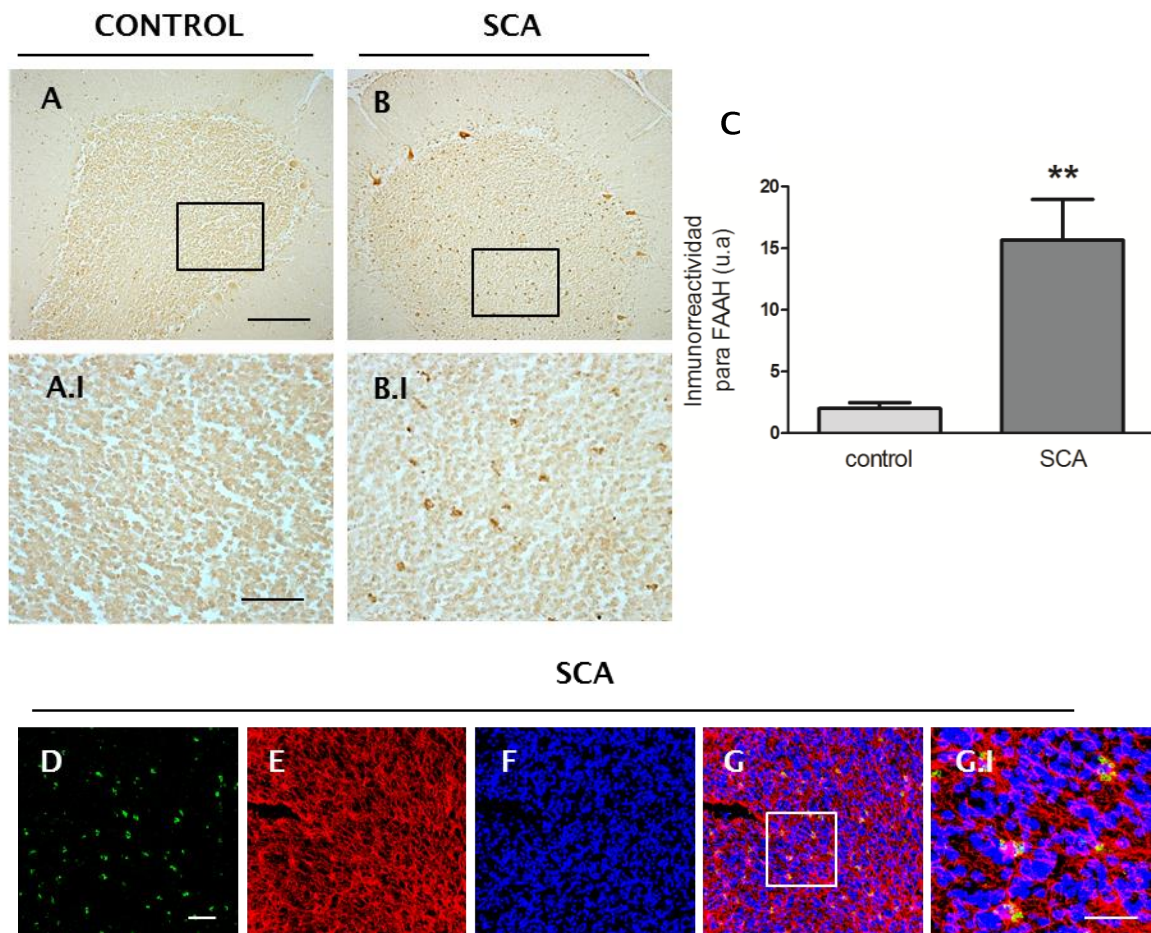


Figura 20. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para la enzima FAAH en la capa granular. Se observa expresión para la enzima FAAH en la capa granular del cerebelo de los enfermos de SCA (B) en comparación con los controles (A). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, $**p < 0.01$ vs control. En estudios de doble marcaje se han identificado las células responsables de ese marcaje como astrocitos (D-G) ya que expresan enzima FAAH (en verde) y el marcador de GFAP (en rojo), en azul se marcan los núcleos y en el paneles G la colocalización de los tres marcadores. Escala de las barras: A, B 200 μ m; A.I, B.I 50 μ m; D-G 100 μ m; G.I 50 μ m.

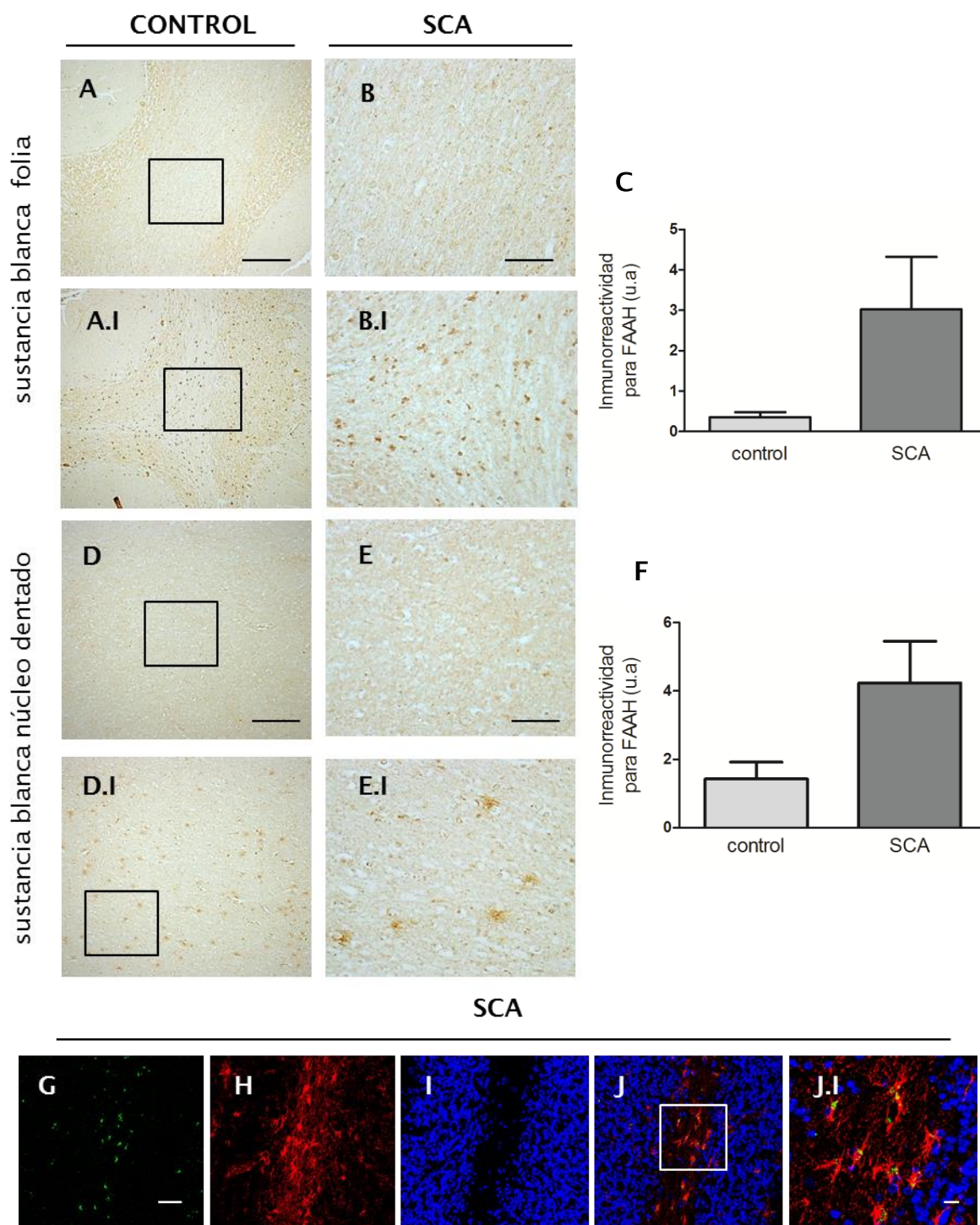


Figura 21. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para la enzima FAAH en la sustancia blanca. Se observa inmunorreactividad para la enzima FAAH en la sustancia blanca del cerebelo de los enfermos de SCA (B, E) en comparación con los controles (A, D). Esta expresión aparece en forma de células dispersas tanto en la sustancia blanca de las folia cerebelosas como la sustancia blanca que rodea el núcleo dentado. En los paneles C y F se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. En estudios de doble marcaje se han identificado las células responsables de ese marcaje como astrocitos (G-J) ya que expresan enzima FAAH (en verde) y el marcador de GFAP (en rojo), en azul se marcan los núcleos y en el paneles J la colocación de los tres marcadores. Escala de las barras: A-E 200µm; A.I-E.I 50µm; G-J 100; J.I 50µm.

1.2.4. Estudio del patrón de distribución de la enzima MAGL

Además de la enzima FAAH, nos hemos interesado en estudiar mediante inmunohistoquímica la enzima MAGL. Ambas tienen un papel crucial en el metabolismo de los endocannabinoides y son susceptibles de servir de dianas farmacológicas para tratamientos neuroprotectores. En nuestro caso, hemos observado inmunorreactividad para la enzima MAGL tanto en el cerebelo de los individuos control como en los enfermos de SCA (Figura 22 A, B). Nuestros resultados identificaron esta enzima en las células de Purkinje y en las neuronas del núcleo dentado igual a lo descrito en estudios previos (Suárez et al., 2008). Nuestros datos revelaron una mayor tinción en las células de Purkinje del cerebelo de los casos de SCA en relación con los controles, como confirmó el análisis densitométrico de las imágenes obtenidas (Figura 22 C). La colocalización de MAGL con el marcador calbindina confirmó la sobreexpresión de esta enzima en el cuerpo celular de las neuronas de Purkinje de los pacientes de SCA en comparación a los controles (Figura 22 D-K).

Además de las células de Purkinje, nuestros análisis revelaron otras células positivas para MAGL en esa región de la corteza cerebelosa. En concreto, observamos una señal intensa en forma de punteado muy próxima a las células de Purkinje (Figura 22 A.I, B.I) que, en base a lo descrito previamente (Tanimura et al., 2012), parece ser la glía de Bergmann. Sin embargo, como ya se mencionó antes los intentos de identificar este tipo celular mediante colocalización con marcadores específicos (L1-NCAM, vimentina y GFAP) no generaron resultados concluyentes por dificultades de tipo metodológico. Cabe destacar que este tipo celular ha sido identificado tanto en los individuos control como en los casos de SCA aunque aparece en mayor magnitud en el cerebelo enfermo.

El marcaje para la enzima MAGL en las neuronas del núcleo dentado fue mucho más evidente en los pacientes de SCA que en los controles (Figura 23 A, B). De hecho, en el cerebelo de los casos control, la señal de MAGL se localiza de forma específica en una pequeña zona situada lateralmente en el cuerpo celular (Figura 23 A.I, B.I), lo que hace suponer que podría tratarse de los terminales de las fibras musgosas que llegan al núcleo dentado procedente de varias áreas cerebrales (Gulyas et al., 2004). Por el contrario, en los enfermos de SCA, el marcaje para MAGL aparece como una señal intensa distribuida de forma homogénea en todo el citoplasma celular, por tanto, presente en las propias neuronas del núcleo dentado. Al igual que se observó para el receptor CB_2 , el incremento de expresión para la enzima MAGL en las células del núcleo dentado de los enfermos de SCA parece estar asociado a la degeneración grumosa que de forma característica ocurre en estas enfermedades (Figura 23 A.II, B.II).

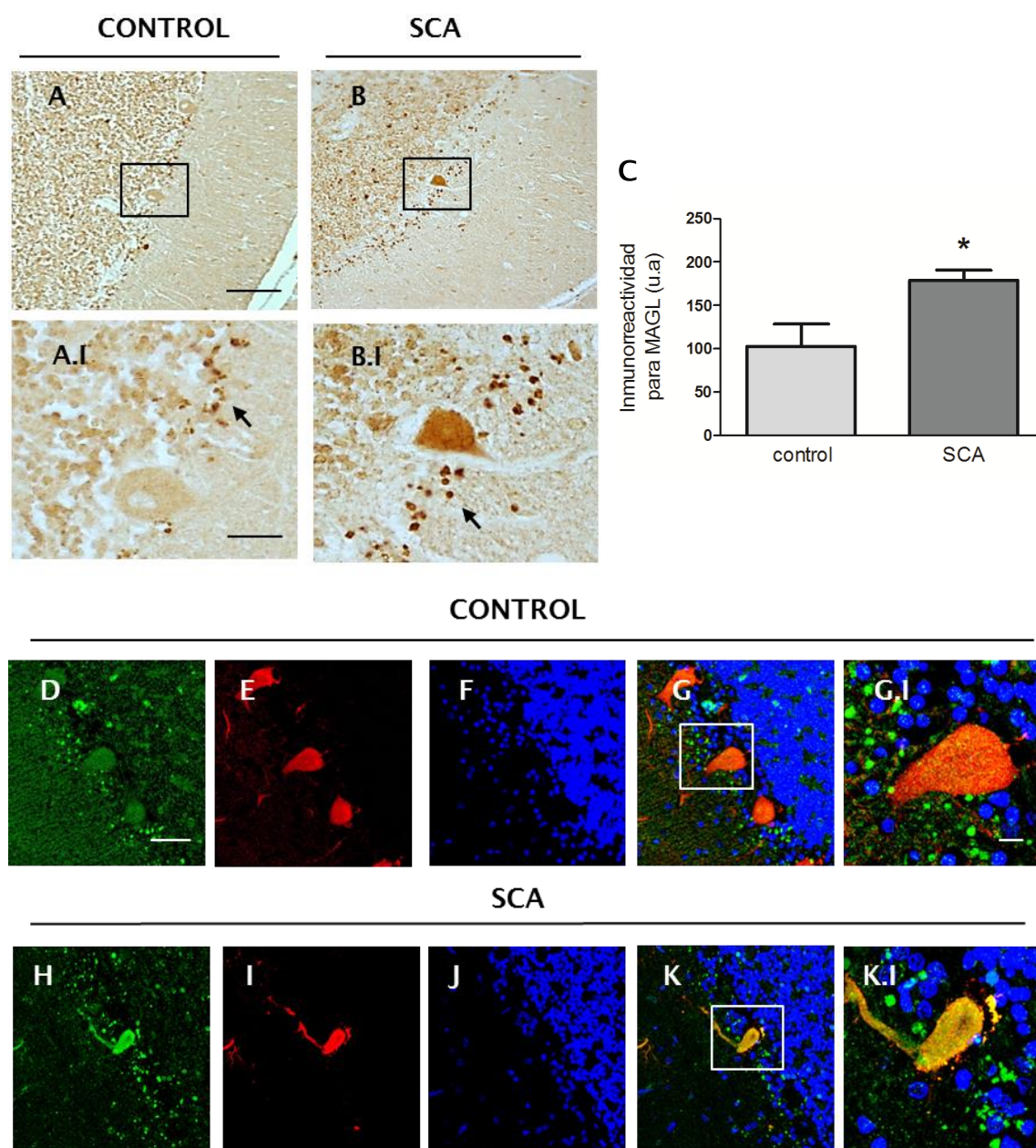


Figura 22. Inmunohistoquímica para la enzima MAGL en la capa de células de Purkinje. Se observa inmunorreactividad para la enzima MAGL en la capa de células de Purkinje de los sujetos control (A) y afectados de SCA (B). Esta expresión se localiza en el soma de las células de Purkinje y en lo que parece ser la glía de Bergmann (flechas en A.I, B.I). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, $*p < 0.05$ vs control. Mediante experimentos de doble inmunofluorescencia se confirma la expresión de la enzima MAGL por las células de Purkinje (G–K) ya que expresan enzima MAGL (en verde) y calbindina (en rojo). En azul se tiñen los núcleos y en los paneles G y K se muestra la colocalización de los tres marcadores, detalles en G.I y K.I. Escala de las barras: A, B 200µm; A.I, B.I 25µm; D–K 50µm; G.I, K.I 10µm.

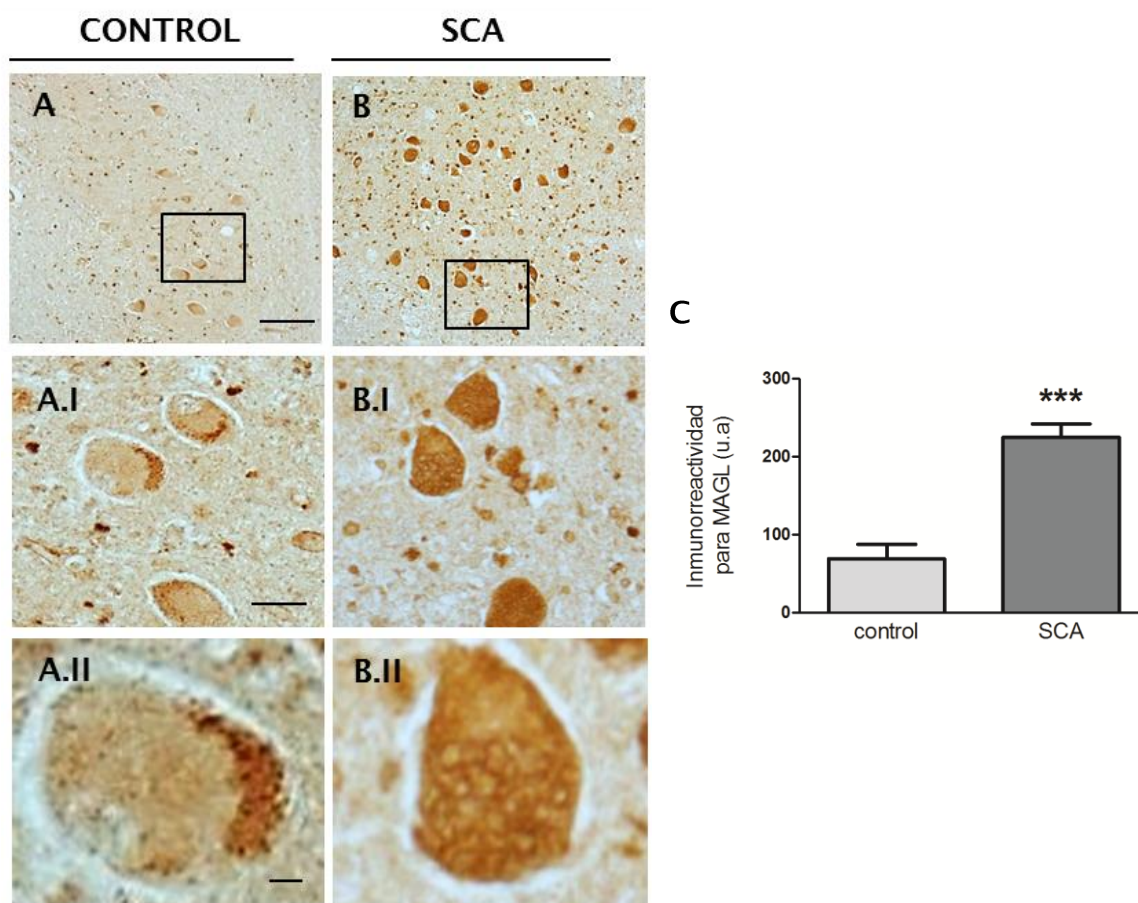


Figura 23. Inmunohistoquímica para la enzima MAGL en las células del núcleo dentado. Se observa expresión para la enzima MAGL en las células del núcleo dentado en el cerebelo de enfermos de controles (A) y pacientes afectados de SCA (B). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, *** $p < 0.001$ vs control. Las células del núcleo dentado de los sujetos afectados de SCA presentan degeneración grumosa (B.II) en comparación con los controles (A.II). Escala de las barras: A, B 100 μ m; A.I, B.I 25 μ m; A.II, B.II 5 μ m.

También se ha encontrado expresión de la enzima MAGL en la capa granular de la corteza cerebelosa como otros autores también han visto (Suárez et al., 2008). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría para el resto de los elementos del sistema cannabinoide endógeno estudiados, no se observaron diferencias entre los sujetos control y los casos de SCA (Figura 24 A, B) aunque es posible que ello se deba en parte a una elevada variabilidad en el grupo de SCA como atestiguó el alto valor del error estándar de la media observado en este grupo. El análisis densitométrico mostró valores similares en cuanto a densidad de marcaje para ambos grupos experimentales (Figura 24 C).

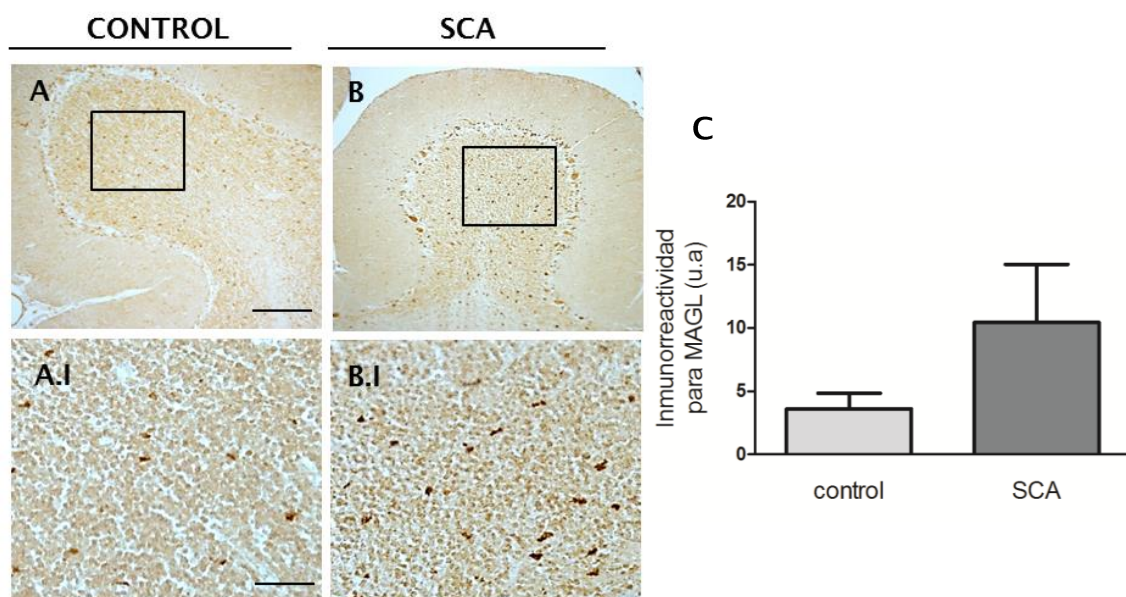


Figura 24. Inmunohistoquímica para la enzima MAGL en la capa granular. Se observa inmunoreactividad para la enzima MAGL en la capa granular del cerebelo de los individuos control (A) y afectados de SCA (B). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student. Escala de las barras: A, B 200µm; A.I, B.I 50µm.

Se analizó también la expresión de MAGL en áreas de sustancia blanca. Nuestros datos revelan una baja inmunotinción para esta enzima en los casos control. En los enfermos de SCA, en cambio, se observa un incremento en el número de células positivas para esta enzima así como de la intensidad de la señal en cada célula (Figura 25 A-E). Este aumento de inmunoreactividad para MAGL se localiza específicamente en la región de sustancia blanca de las folias cerebelosas, como se pudo comprobar mediante el análisis de las imágenes microscópicas (Figura 25 A-C). Mediante experimentos de doble inmunofluorescencia, se identificaron las células que expresan MAGL como astrocitos (Figura 25 G-J). En conclusión, nuestros datos revelaron un aumento significativo en la expresión de la enzima MAGL de forma similar a lo observado previamente por otros autores en situaciones de daño agudo como la lesión medular (García-Ovejero et al., 2009) o en situaciones de daño crónico, como en la enfermedad de Alzheimer (Farooqui et al., 1988; Mulder et al., 2011).

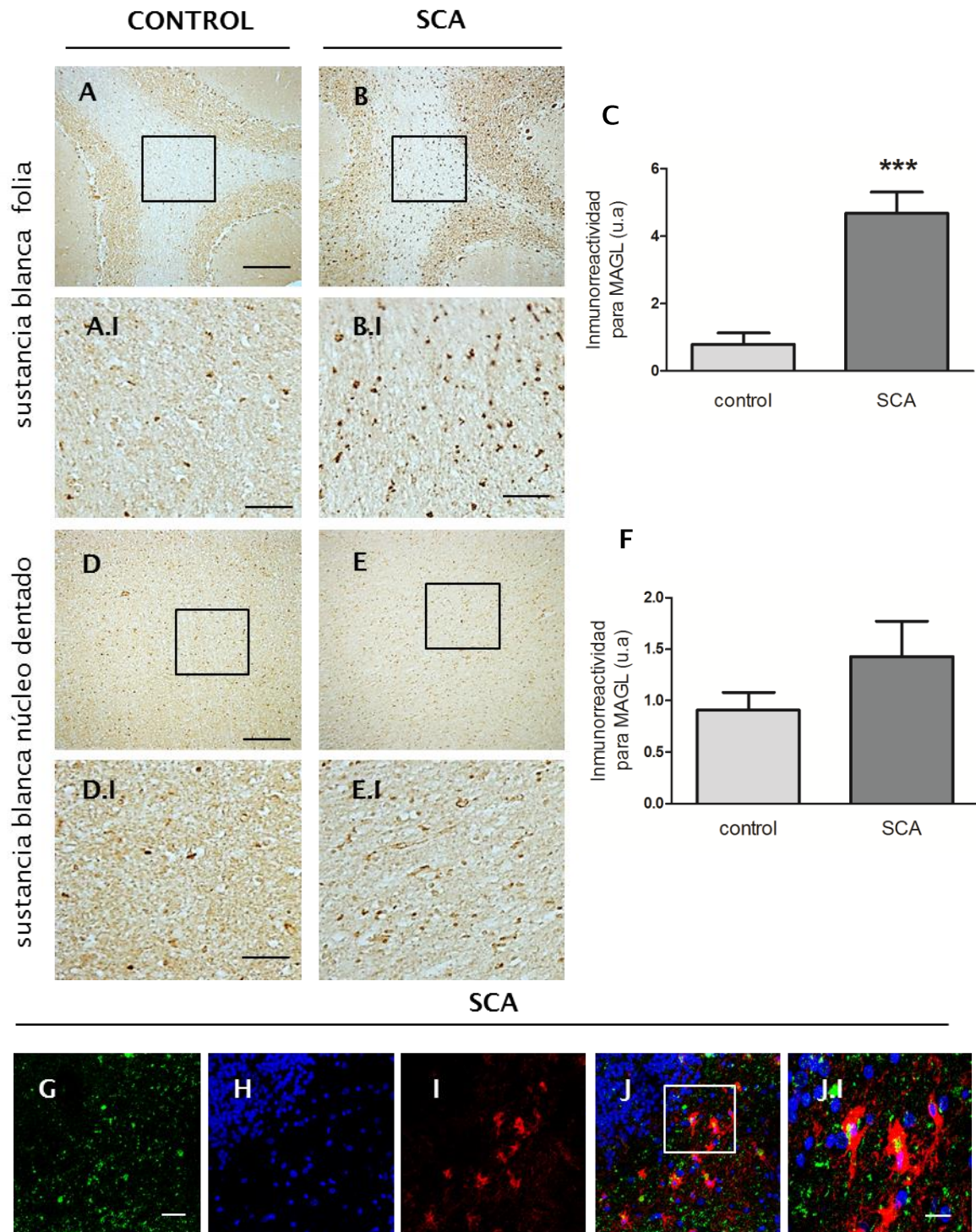


Figura 25. Inmunohistoquímica y doble inmunofluorescencia para la enzima MAGL en la sustancia blanca. Se observa expresión de la enzima MAGL en la sustancia blanca del cerebelo de los sujetos control (A, D) y enfermos de SCA (B, E): sustancia blanca subcortical (A, B) y sustancia blanca que rodea el núcleo dentado (D, E). En los paneles C y F se muestra el análisis cuantitativo de las imágenes en las dos áreas cerebrales. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo, posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, $***p < 0.001$ vs control. Mediante experimentos de doble inmunofluorescencia se confirma la expresión de la enzima MAGL en astrocitos de la sustancia blanca (G-J) ya que expresan enzima MAGL (en verde) y GFAP (en rojo), en azul se tiñen los núcleos y en el panel J se muestra la colocolización de los tres marcadores, detalles en J.I. Escala de las barras: A-E 200µm; A.I-E.I 50µm; G-J 100; J.I 50µm.

1.3. DISCUSIÓN PARCIAL

El objetivo de este diseño experimental era investigar el sistema endocannabinoide en el cerebelo de pacientes afectados de SCA. Como paso previo al análisis de este sistema de señalización (en concreto los receptores cannabinoide CB_1 y CB_2 y las principales enzimas de degradación de endocannabinoides, las enzimas FAAH y MAGL) en este diseño experimental se procedió a confirmar que las muestras de cerebelo *post mortem* procedentes de los pacientes de SCA tenían las alteraciones neuropatológicas descritas para este tipo de enfermedades.

1.3.1. Evaluación neuropatológica del cerebelo de los pacientes de SCA

Las observaciones realizadas en nuestro estudio sobre muestras de cerebelo *post mortem* de pacientes de SCA se pueden agrupar en dos tipos de respuesta: (i) se ha observado un incremento en la expresión de varios elementos del sistema cannabinoide endógeno en las células que degeneran en estas enfermedades, como las células de Purkinje y las células del núcleo dentado y (ii) se ha observado un incremento en la expresión de varios elementos del sistema cannabinoide endógeno en células gliales en diferentes áreas del cerebelo (sustancia blanca y capa granular de la corteza cerebelosa) de pacientes afectados por algún tipo de SCA.

Es importante señalar que, debido a las dificultades para reclutar un número suficiente de muestras para cada tipo de SCA (ver explicaciones y detalles en Materiales y Métodos), nuestro grupo experimental solo está formado por un caso para cada uno de los tipos más representativos de SCAs. *A priori* esto podría representar un problema para conseguir resultados fiables dado que estas SCAs presentan cierta heterogeneidad en el patrón de degeneración que se observa en cada caso. Sin embargo, la afectación del cerebelo se ha documentado en todos los tipos de SCA incluidos en este estudio (Matilla-Dueñas, 2012; Rüb et al., 2013). La información neuropatológica proporcionada por el biobanco y nuestro examen preliminar de todas las muestras *post mortem* nos han permitido confirmar estas pérdidas neuronales, que se han centrado tanto en las células de Purkinje como en las neuronas del núcleo dentado. Además de la degeneración neuronal, nuestros experimentos de inmunohistoquímica han demostrado la existencia de una marcada activación glial en el cerebelo de los enfermos de SCA en comparación con los controles. Esta activación glial se vio reflejada principalmente en un aumento del número de células de microglía, células que, además, presentaban una morfología característica de un estado activado. El análisis de expresión del marcador de astrocitos GFAP ha puesto en evidencia que también existe un aumento de los procesos de astrogliosis en el cerebelo de los individuos enfermos de SCA, especialmente en la corteza cerebelosa, en la glía de Bergmann.

1.3.2. Análisis del sistema SCE en el cerebelo de los pacientes de SCA

El principal hallazgo de este diseño experimental centrado en muestras humanas *post mortem* ha sido la demostración de que varios elementos clave del sistema endocannabinoide (los receptores CB_1 y CB_2 y las enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL) se modifican significativamente en el cerebelo de los pacientes de SCA en comparación con los

sujetos control, alteraciones que han sido demostradas previamente en otras enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz et al., 2014). Además, es importante destacar, que a pesar de las diferentes características que presentan estas enfermedades, el análisis de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, así como las enzimas FAAH y MAGL, evidenció un patrón de respuesta muy similar en todos los casos estudiados, independientemente del tipo de SCA al que pertenecieran, lo que apoya la validez de nuestro diseño experimental. Por supuesto, habría sido mejor concentrarse en un solo tipo de SCA, pero, en la actualidad, es difícil reunir, a partir de los biobancos con muestras de este grupo de enfermedades, un número suficiente de sujetos del mismo tipo SCA de forma que estén adecuadamente emparejados por sexo, edad e intervalo *post mortem* con respecto a los sujetos control, y, así mismo, que no tengan que ser excluidos debido a la posible influencia en los resultados de sus historias de medicación y/o consumo de drogas. En nuestro estudio, fuimos extremadamente cuidadosos en la selección de los casos de SCA y de los sujetos control, por ejemplo, se excluyeron todos los casos en los que se conocía la existencia de un consumo previo de cannabis o de adicción al alcohol u otras drogas lo que redujo en parte la disponibilidad inicial de muestras. Lo mismo ocurrió al excluir de la cohorte los casos en los que los pacientes no habían tomado una medicación estándar. Sin embargo, a pesar de estas dificultades de reclutamiento de las muestras y también a pesar de las características específicas de cada tipo de SCA, podemos concluir que hemos encontrado las mismas respuestas para los distintos elementos del sistema cannabinoide endógeno estudiados, lo que apoya la validez de nuestro enfoque experimental.

El estudio de la distribución de los receptores CB₁ indica que en el cerebelo de enfermos de SCA este tipo de receptor experimenta un incremento que se extiende a todas las estructuras cerebelosas objeto de investigación en este trabajo, tanto áreas de sustancia gris (células de Purkinje, capa granular de la corteza cerebelosa y núcleo dentado) como áreas de sustancia blanca (sustancia blanca de las folia cerebelosas y la que rodea a los núcleos profundos). En relación a las células de Purkinje, principales células afectadas en este grupo de enfermedades en los pacientes enfermos de SCA, se observa un incremento de las terminaciones CB₁ positivas que llegan al soma celular y que corresponden con los terminales de las células en cesto, un tipo de interneurona inhibitoria del cerebelo (Ashton et al., 2004; Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998). Por otro lado, se detecta también inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el soma de las células de Purkinje de los pacientes con SCA, algo que no ocurre en el cerebelo de los individuos control. Esta expresión aparece de forma más evidente en las células que presentan mayor grado de degeneración lo que se ha podido medir por la menor inmunorreactividad de la proteína calbindina, de manera que es posible que esta sobreexpresión de los receptores CB₁ pueda servir como un marcador de las células que van a degenerar. Las otras neuronas afectadas en estas enfermedades, las neuronas del núcleo dentado, también presentan un aumento en la expresión del receptor CB₁ en comparación con un marcaje significativamente menor en los casos control (Suárez et al., 2008). La sobreexpresión de los receptores CB₁ se postula que quizás puede contribuir a la disfunción o incluso a la degeneración del cerebelo durante la patogénesis de las SCAs. Esta hipótesis estaría en concordancia con los datos previos que han demostrado que la activación de los receptores CB₁ produce de hecho ataxia en algunas especies animales (DeSanty y Dar, 2001; Patel y Hillard, 2001). Es posible, por tanto, que el aumento de los receptores CB₁ que hemos observado en el cerebelo de pacientes de SCA pueda estar relacionado con la aparición de ataxia en estos sujetos. Sin embargo, es importante destacar que a pesar de

observar un incremento en la expresión de este receptor en las células que sobreviven, dada la significativa pérdida de células que se da en la enfermedad, los niveles totales de este receptor serán menores en comparación con los sujetos control. Como ya se ha avanzado anteriormente, este tipo de respuesta de los receptores CB₁ incremento en la expresión del receptor CB₁ se ha descrito previamente en otra enfermedad neurodegenerativa como es la enfermedad de Parkinson. En los pacientes con esta enfermedad se produce un aumento de los receptores CB₁ de cuyo activación puede derivar la rigidez y la bradiquinesia típicas de la enfermedad de Parkinson (Fernández-Ruiz, 2009; Fernández-Ruiz et al., 2011). Sin embargo, en la enfermedad de Parkinson, el incremento de los receptores CB₁ se produce en una subpoblación de neuronas que no degeneran en la enfermedad (Fernández-Ruiz, 2009). En las SCAs, en cambio, nuestros datos demuestran que la sobreexpresión de los receptores CB₁ ocurre en las subpoblaciones de neuronas que degeneran. Estos hallazgos suponen el primer caso documentado de trastornos neurodegenerativos en los que se observa este tipo de respuesta. Es posible sin embargo realizar una interpretación alternativa que sería que la sobreexpresión de los receptores CB₁ en las neuronas del cerebelo pudiera representar una respuesta protectora para atenuar la disfunción cerebelosa. Teniendo en cuenta que este receptor media muchos de los mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides, esta última posibilidad puede aplicarse también a la respuesta de los receptores CB₁ en las otras áreas del cerebelo estudiadas, es decir, en la capa granular y en las áreas de sustancia blanca. El incremento de expresión observado en estas estructuras en las SCAs se encuentra en elementos gliales y experimenta un marcado aumento, probablemente relacionado con los estados reactivos exhibidos por estas células durante la patología. En particular, nuestros datos demuestran un aumento del receptor CB₁ en células de microglía, macrófagos y astrocitos. El incremento en la expresión del receptor CB₁ en estas células gliales ya se ha detectado en el cerebro *post mortem* de otras patologías neurológicas como la esclerosis múltiple (Benito et al., 2007), y se ha propuesto que puede ser parte de mecanismos de protección endógena activados como respuesta al daño, para promover respuestas anti-inflamatorias inhibiendo la producción de NO y de mediadores pro-inflamatorios (Cabral et al., 2001; Esposito et al., 2006; Garcia-Ovejero et al., 2009; Ortega-Gutiérrez et al., 2005; Sheng et al., 2005; Waksman et al., 1999).

De forma similar a lo que ocurre para el receptor CB₁, nuestros datos también evidencian una inducción de la expresión de los receptores CB₂ en el cerebelo *post mortem* de pacientes con SCA y que esto ocurre en todas las estructuras del cerebelo estudiadas. Además, los experimentos de inmunofluorescencia nos permitieron identificar las células que expresan el receptor CB₂ como microglía, localizada en la capa granular del cerebelo y en la sustancia blanca así como astrocitos de la sustancia blanca. Este tipo de respuesta del receptor CB₂ en las células de microglía ya se ha descrito previamente en tejido cerebral de enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003), enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009), enfermedad de Parkinson (Gómez-Gálvez et al., 2015), esclerosis múltiple (Benito et al., 2007) y esclerosis lateral amiotrófica (Yiangou et al., 2006). La presencia del receptor CB₂ en las células de microglía se ha asociado al cambio de fenotipo que experimentan estas células durante los procesos de activación por daño cerebral de origen inflamatorio, infeccioso, traumático o tóxico (Benito et al., 2008). Parece ser que, en estas condiciones, la activación de los receptores CB₂ actuaría como regulador de los procesos de proliferación y migración microglial, así como reduciría la toxicidad de estas células (por ejemplo, disminuyendo la generación de citoquinas

proinflamatorias), desempeñando de esta forma un papel protector de la homeostasis neuronal (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2008).

También hemos detectado inmunorreactividad para el receptor CB₂ en astrocitos de la sustancia blanca del cerebelo de los pacientes de SCA, de forma similar a lo observado también en otros estudios realizados en muestras de tejido encefálico de pacientes afectados por esclerosis múltiple (Benito et al. (2007). También hemos visto que los astrocitos perivascuales expresan receptores CB₂ en el cerebelo como respuesta a la degeneración neuronal producida en las SCAs. Por último, es importante destacar que, a pesar de que nuestros resultados de colocalización no fueron concluyentes, nuestros datos sugieren también la expresión del receptor CB₂ en la glía de Bergmann. Este tipo de célula astrocitaria especializada está involucrada en casi la totalidad de las sinapsis inhibitoras y excitadoras que las células de Purkinje establecen con otras neuronas del cerebelo, ejerciendo de esta forma importantes funciones reguladoras en la transmisión sináptica (Bordey y Sontheimer, 2003; Riquelme et al., 2002). Esta es la primera vez que se describe la expresión del receptor CB₂ en este tipo de astrocitos. Nuestros datos demuestran que hay expresión de dicho receptor en la glía de Bergmann tanto en los cerebelos procedentes de individuos control como en los enfermos de SCA, siendo la inmunorreactividad en estos últimos en estos últimos mucho más marcada. Poco se sabe acerca del papel que los receptores CB₂ juegan en los astrocitos, aunque datos previos sugieren que podrían modular la producción de moléculas antiinflamatorias y proinflamatorias *in vitro* (Ortega-Gutiérrez et al., 2005b; Sheng et al., 2005), así como regular los procesos metabólicos (tróficos) con los que estas células ayudan a la homeostasis neuronal (Sánchez et al., 2003).

A pesar de que el receptor CB₂ ha sido considerado durante mucho tiempo un receptor eminentemente glial, cada vez más trabajos sugieren la presencia de este receptor en algunas subpoblaciones neuronales, preferentemente en el tallo cerebral, en el cerebelo y en el mesencéfalo (García et al., 2015; Lanciego et al., 2011; Van Sickle et al., 2005; Skaper et al., 1996). En nuestros experimentos de inmunohistoquímica hemos observado marcaje para este receptor en las células de Purkinje. Sin embargo, nuestros datos revelan que la expresión del receptor CB₂ aparece solo en las muestras de los pacientes de SCA, no en el cerebelo de los sujetos control. La presencia del receptor CB₂ ha sido recientemente descrita en las neuronas que se mueren en otra enfermedad degenerativa, la enfermedad de Parkinson (García et al., 2015) aunque, en este caso, los niveles de receptor neuronal CB₂ siempre fueron mayores en controles que en pacientes tanto a nivel global como analizando la expresión en cada célula (García et al., 2015). El caso de las SCAs representa la primera vez que se ve un tipo de respuesta al alza del receptor CB₂ en las células cuando estas degeneran en la enfermedad. Sin embargo, es importante destacar que, debido a la pérdida de células de Purkinje durante la patogénesis, los niveles de este receptor analizaos de forma global se reducirían en los pacientes de SCA en comparación con los controles. Como se ha descrito previamente para el receptor CB₁, estos hallazgos pueden sugerir dos implicaciones fisiopatológicas. Por un lado, el incremento en la expresión del receptor CB₂ puede estar directamente implicado en la disfunción/degeneración de estas células, o bien que esta sobreexpresión pueda actuar como un mecanismo neuroprotector endógeno. Por otro lado, la expresión de receptores CB₂ en las células que degeneran en la enfermedad permitiría proponer a este receptor como un posible biomarcador de degeneración de esta subpoblación neuronal.

Además de la sobreexpresión del receptor CB₂ en las células de Purkinje en degeneración, nuestros datos también muestran marcaje de este receptor en las neuronas del núcleo dentado, una señal que se ha identificado que corresponde a los terminales de las fibras musgosas que ascienden hasta el cerebelo procedentes de varias regiones cerebrales como la médula y tronco cerebral (Suárez et al., 2008). Este incremento en la expresión del receptor CB₂ en el núcleo dentado se ha asociado a la proliferación de terminales sinápticos patológicos, un tipo de lesión histológica característica de estas enfermedades que se denomina degeneración grumosa (Koeppen, 2005).

Nuestros estudios en muestras humanas *post mortem* también han incluido el análisis del patrón de expresión de las principales enzimas implicadas en la degradación de endocannabinoides, las enzimas FAAH y MAGL que representan posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de estas patologías. Nuestros datos indican que ambas enzimas están presentes de forma más abundante en el cerebelo de los individuos enfermos de algún tipo de SCA cuando se compara con los controles. Hemos detectado inmunorreactividad para FAAH en las células de Purkinje de cerebelos control, principalmente en el cuerpo celular con un marcaje preferentemente perinuclear (Romero et al., 2002). En los cerebelos de los enfermos de SCA, en cambio, nuestros datos ponen de manifiesto que la enzima FAAH se expresa de forma muy abundante y con una distribución homogénea por todo el soma celular. Además, hemos observado que, los cambios observados en la expresión de la enzima FAAH en el cerebelo de los individuos afectados por las SCAs presentan una evidente selectividad celular, puesto que FAAH se sobre-expresa en astrocitos, de forma similar a los datos previos obtenidos en tejido cerebral de distintas neuropatologías humanas como la enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003), la esclerosis múltiple (Benito et al., 2007) y el síndrome de Down (Núñez et al., 2008). La presencia de FAAH en estas células sugiere un patrón común de respuesta en estas patologías incluida las SCAs, de forma que esta enzima podría tener una participación directa en el proceso inflamatorio ligado a las enfermedades neurodegenerativas, incluso la inhibición de esta enzima podría tener efectos beneficiosos durante este proceso, debido al descenso de la producción local de ácido araquidónico y el aumento del tono endocannabinoide (Benito et al., 2003; Karanian et al., 2005).

El último elemento del sistema cannabinoide endógeno que hemos analizado es la enzima MAGL, que se sabe que se expresa de forma abundante en el cerebelo (Suárez et al., 2008). Nuestros datos evidencian de forma similar a lo observado para los otros elementos del sistema cannabinoide endógeno, que se produce un incremento de la enzima MAGL en las muestras de SCA en comparación con la situación en los controles. Este aumento de expresión se observa en las células que degeneran en la enfermedad: en las células de Purkinje, como revela el doble marcaje inmunofluorescente con calbindina, y en los terminales degenerados de las fibras musgosas que sinaptan con las neuronas del núcleo dentado. Es importante destacar que esta es la primera vez que se describe la expresión de las dos enzimas de degradación de endocannabinoides de forma paralela. Hasta ahora se creía que la distribución de ambas enzimas era diferente y complementaria, es decir, la expresión de la enzima FAAH se restringía a los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas mientras que la enzima MAGL se expresaría en los terminales axónicos, lo que estaría de acuerdo con una localización postsináptica y presináptica de las enzimas FAAH y MAGL, respectivamente. Por lo tanto, nuestros resultados proponen, además de cambios en los niveles de expresión, cambios en la localización de estas

enzimas, algo que también ocurre en el caso de los receptores CB₁ y CB₂. Estos hallazgos sugieren una respuesta adaptativa de este sistema de señalización ante la situación de daño que se da en el cerebelo durante el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, y de forma similar a los resultados obtenidos para la enzima FAAH, se detectaron niveles elevados de MAGL en astrocitos localizados en la sustancia blanca de las folia cerebelosas y en lo que, por su localización y por lo descrito en trabajos previos (Tanimura et al., 2012), parece ser la glía de Bergmann, aunque esto último no lo pudimos comprobar con los estudios de doble marcaje. Esta presumible presencia en la glía de Bergmann es interesante ya que se ha descrito que la función de este tipo de glía es importante para mantener un adecuado funcionamiento del cerebelo, ya que la ablación de estas células gliales en ratones adultos produce la degeneración de las neuronas de la corteza del cerebelo y altera la coordinación motora (Cui et al., 2001). Se podía esperar que el incremento de MAGL observado en la glía de Bergmann de los pacientes con SCA podría precipitar la finalización de la señalización mediada por el 2-AG en los procesos de DSE y/o DSI en los que están implicadas las células de Purkinje afectando así a la regulación de la transmisión sináptica del cerebelo (Tanimura et al., 2012).

A modo de conclusión de este diseño experimental llevado a cabo en muestras *post mortem* de pacientes, se puede decir que se ha descrito por primera vez la existencia de alteraciones importantes en el patrón de expresión de los receptores CB₁ y CB₂, así como de las enzimas FAAH y MAGL, en el cerebelo de pacientes afectados por algún tipo de SCA. Estos cambios se pueden agrupar en dos tipos de respuesta. Por un lado, nuestros resultados muestran que estos cambios están ligados al proceso degenerativo, ya que el incremento de expresión de estos elementos en neuronas presenta una evidente selectividad celular, puesto que todos los elementos estudiados se sobre-expresan en las células que degeneran en la enfermedad. Por otro lado, nuestros datos demuestran un incremento en la expresión de varios elementos del sistema cannabinoide endógeno en elementos gliales en el cerebelo de enfermos de SCA, lo que podría indicar que el sistema endocannabinoide podría hiperactivarse en células gliales bajo condiciones de daño celular (Pazos et al., 2005). En base a esto la expresión glial de estos elementos del sistema cannabinoide endógeno podría actuar como marcador de inflamación en el SNC en estas enfermedades y también servir de posible diana farmacológica para modular esta respuesta glial.

En cuanto a la relación que existe entre la sobre-expresión de los diferentes elementos del sistema cannabinoide endógeno y la degeneración característica de estas enfermedades. Nuestros datos muestran que en el cerebelo de los pacientes SCA podría haber un aumento de la señalización presenta un aumento en la señalización endocannabinoide mediada por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, junto a una supuesta reducción en los niveles de endocannabinoides debido a una mayor degradación de estos por las enzimas FAAH y MAGL. Estos dos hechos, que *a priori* pueden parecer contradictorios, pueden estar relacionados con un primer efecto primario (el aumento de los receptores CB₁ y CB₂), y una respuesta secundaria compensatoria (el incremento en los niveles de las enzimas de degradación), con el propósito de reducir la disponibilidad de los ligandos endocannabinoides y recuperar la señalización endocannabinoide normal. Sin embargo, la explicación contraria también es posible. Esto implicaría que el efecto primario sería el aumento de las enzimas que inactivan los endocannabinoides, lo que produciría una disminución de los niveles de estos ligandos endógenos provocando una respuesta habitual en la regulación de las interacciones receptor-

ligando, es decir, la regulación positiva de los receptores y/o un aumento de su actividad. Esta respuesta estaría dirigida a compensar los niveles reducidos de los endocannabinoides. ¿Cuál de las dos opciones operara en este caso? Con los datos de esta parte del estudio no lo podemos saber ya que los tejidos post mortem utilizados en este estudio corresponden a las etapas más avanzadas de la enfermedad, por lo que no es posible dilucidar cuál es el efecto primario y cual la respuesta compensatoria. Para intentar responder esta cuestión, se ha llevado el siguiente diseño experimental en el que se ha utilizado un modelo de ratón transgénico de la SCA3, la forma más prevalente de estas enfermedades.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL II: Caracterización del sistema endocannabinoide en un modelo animal de ataxia espinocerebelosa tipo 3

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías crónicas complejas, caracterizadas todas ellas por el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración selectiva de determinadas subpoblaciones neuronales. Las manifestaciones clínicas en estas enfermedades normalmente aparecen en estadios tardíos, cuando el grado de degeneración es alto y, en la mayor parte de los casos, irreversible. El hecho de que los síntomas sean leves o incluso inexistentes al comienzo de la degeneración en estas patologías hacen muy difícil el diseño de un tratamiento eficaz que permita enlentecer o frenar el progreso de la enfermedad. En este sentido, la generación de modelos animales ha supuesto un gran avance ya que nos permite realizar distintos abordajes experimentales para averiguar los mecanismos involucrados en la patología, así como para identificar potenciales dianas terapéuticas. En este contexto, y a la vista de los cambios observados en algunos elementos del SCE en el cerebelo de pacientes enfermos de SCA, abordamos el estudio de este sistema de señalización en un modelo animal de la SCA3, la forma más prevalente de SCA. Es importante destacar antes de todo, que se trata de un modelo parcial de la enfermedad. La modelización de las SCAs en animales de experimentación es todavía un tema con poco recorrido, lo que complica poder avanzar en el conocimiento de esta enfermedad a diferencia de lo que ha pasado con otras. Desde que se identificó la mutación responsable de la enfermedad (Takiyama et al., 1993) han sido desarrollados varios modelos transgénicos de la SCA3 (Gould, 2012; Riess et al., 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos son controvertidos en cuanto a las regiones cerebrales y los tipos de células afectados en la enfermedad (Gould, 2012; Yamada et al., 2008). En el presente trabajo de investigación se utilizó un nuevo modelo transgénico para la SCA3 (Silva-Fernandes et al., 2014) que creemos que es uno de los mejores modelos actuales a pesar de su parcialidad, y creemos que nos ha permitido obtener resultados interesantes para nuevas investigaciones que continúen el trabajo de esta Tesis Doctoral.

2.1. EVALUACIÓN DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD

Como se ha comentado en la Introducción, la SCA3 es una enfermedad genética. Esta enfermedad principalmente se manifiesta por falta de equilibrio, descoordinación de las extremidades superiores y deterioro en el control de los movimientos voluntarios. Los pacientes afectados de SCA3 comienzan presentando trastornos en la marcha y, a medida que la enfermedad avanza, la ataxia se va haciendo progresivamente más severa observándose otros síntomas de disfunción cerebelosa como la hiperreflexia, hipotonía o dismetría. En las fases avanzadas de la enfermedad se observa, además, atrofia muscular, distonía y corea (Jacobi et al., 2013; Matilla-Dueñas, 2012; Rüb et al., 2013). Este tipo de sintomatología aparece en cierta forma en el modelo experimental de SCA3 que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral, y lo primero que hemos hecho ha sido realizar una exhaustiva caracterización, tanto funcional como neuropatológica, con el fin de validar estos animales como modelo de la enfermedad.

2.1.1. Evaluación funcional y supervivencia

El primer paso en este diseño experimental ha sido examinar las alteraciones fenotípicas y funcionales que presentaban los ratones transgénicos SCA3. Para ello, se determinó el estado de salud general de los animales a medida que progresaba la enfermedad, mediante la medida del peso del animal y la observación de su apariencia física. Para evaluar los diferentes aspectos de la actividad y coordinación motora de estos animales se realizaron distintas pruebas de comportamiento que se centraban en aspectos específicos de esa actividad: Rotarod (coordinación motora), barra de equilibrio (equilibrio), *hanging wire* (fuerza motora), *clasping* (distonía) y *footprinting* (marcha). Por otro lado, también se analizó la actividad metabólica en distintas regiones cerebrales mediante PET para identificar posibles alteraciones que sean representativas de la evolución de la enfermedad.

2.1.1.1. Estado de salud general

A las 7 semanas de edad los ratones transgénicos SCA3 eran fenotípicamente indistinguibles de sus hermanos *wildtype* de camada. Sin embargo, durante la aparición progresiva de los síntomas se hacía fácil identificar a los ratones transgénicos de los *wildtype* por su apariencia física (Figura 1 A, B). Tanto los ratones *wildtype* como los transgénicos mostraron un incremento en el peso corporal similar hasta aproximadamente las 15 semanas de edad. Sin embargo, a partir de esa edad, el peso de los animales transgénicos se estabilizó, mientras que los animales control continuaban ganando peso (Figura 1C).

A partir de las 19 semanas, los ratones transgénicos comienzan a presentar un aspecto poco saludable. Estos animales, además de ser mucho más pequeños que sus hermanos *wildtype*, presentaban una evidente pérdida de tono muscular y temblores. En etapas más avanzadas de la enfermedad (a partir de las 35 semanas de edad) los animales transgénicos SCA3 presentaban una postura anormal, típica de la disfunción del cerebelo y tronco encefálico,

en la que los animales aparecían como si estuvieran acostados sobre su abdomen con las extremidades delanteras y traseras extendidas lateralmente (Modianos y Pfaff, 1976). En esta fase de la enfermedad, los animales transgénicos presentan además una actividad locomotora y exploratoria claramente disminuida en comparación con los ratones *wildtype* (datos no mostrados). Estos síntomas, se hacen más evidentes a medida que progresa la enfermedad alcanzando un perfil claramente hipoquinético en las fases más avanzadas de la enfermedad, en torno a las 43 semanas de edad. A esta edad, en los animales transgénicos SCA3 se observó, además, una evidente curvatura de la columna vertebral en la región dorsal conocida como cifosis. Una alteración que se ha observado previamente en otros modelos de la SCA3 (Gould, 2012; Riess et al., 2008) (Figura 1 D, E).

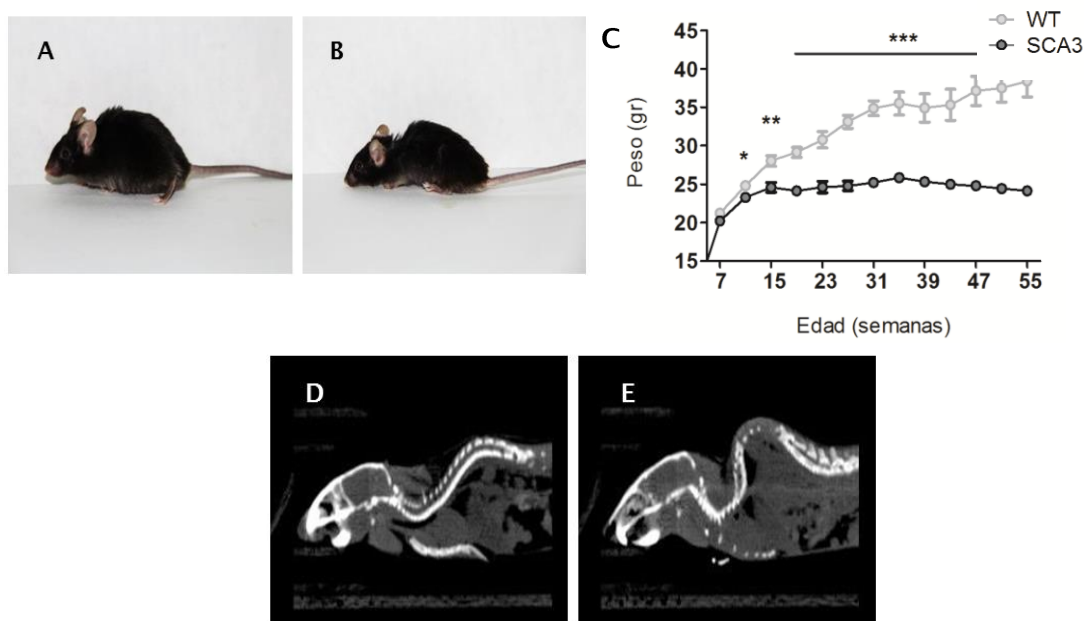


Figura 1. Evaluación de diferentes parámetros cuantitativos o cualitativos que reflejan el estado de salud general de los animales transgénicos SCA3. Imagen representativa de ratones WT (A) y TG (B) de 56 semanas de edad. Monitorización del peso de los animales SCA3 y WT (C). Los valores se expresan como la media \pm SEM. En las edades avanzadas de la enfermedad los ratones modelo de SCA presentan cifosis torácica (E), en comparación con los controles (D). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para valores repetidos seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control).

A pesar de la clara afectación de los animales SCA3 desde las 19 semanas de edad, no es hasta las 62 semanas de edad que estos animales comienzan a morir como consecuencia de la degeneración asociada a la enfermedad situación que hemos cuantificado mediante curvas de Kaplan-Meier (Figura 2). En general, se puede decir que el fenotipo observado en los ratones CMVMJD135 en relación a los parámetros cuantitativos y cualitativos que reflejan el estado de salud general de los animales, se correlaciona bastante bien con los síntomas descritos previamente para los pacientes enfermos de este subtipo de SCA y también en el caso de otros modelos animales de esta enfermedad (Gould, 2012; Jacobi et al., 2013).

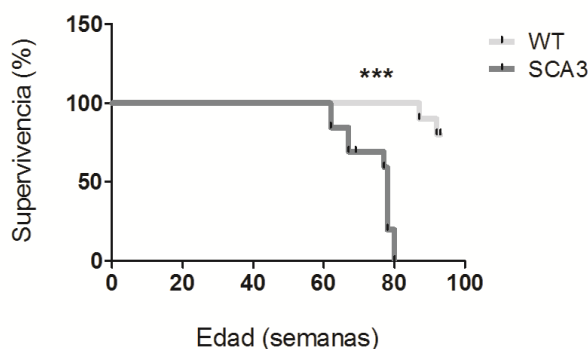


Figura 2. Supervivencia de los animales transgénicos de SCA3. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los ratones transgénicos SCA3 y animales WT. Los datos corresponden a 10-15 animales por grupo experimental. Los datos se analizaron mediante el test estadístico de Long Rank (***) $p < 0.001$ vs WT).

2.1.1.2. Actividad motora y coordinación

Los ratones CMVMJD135 manifestaron síntomas motores similares a los que presentan los enfermos de SCA3 (Silva-Fernandes et al., 2014). Nuestros datos mostraron que las primeras alteraciones motoras se observan ya a las 7 semanas de edad, antes incluso que haya diferencias en el peso de los animales. A esta edad los animales SCA3 presentaban una pérdida de fuerza motora en las extremidades, medida por una significativa disminución en el tiempo que el animal permanecía suspendido en una rejilla (test de *hanging wire*) (Figura 3 A). Esta pérdida de fuerza motora se observó principalmente en las extremidades traseras y se hizo más evidente a medida que la edad de los animales aumentaba (Figura 3 B-E).

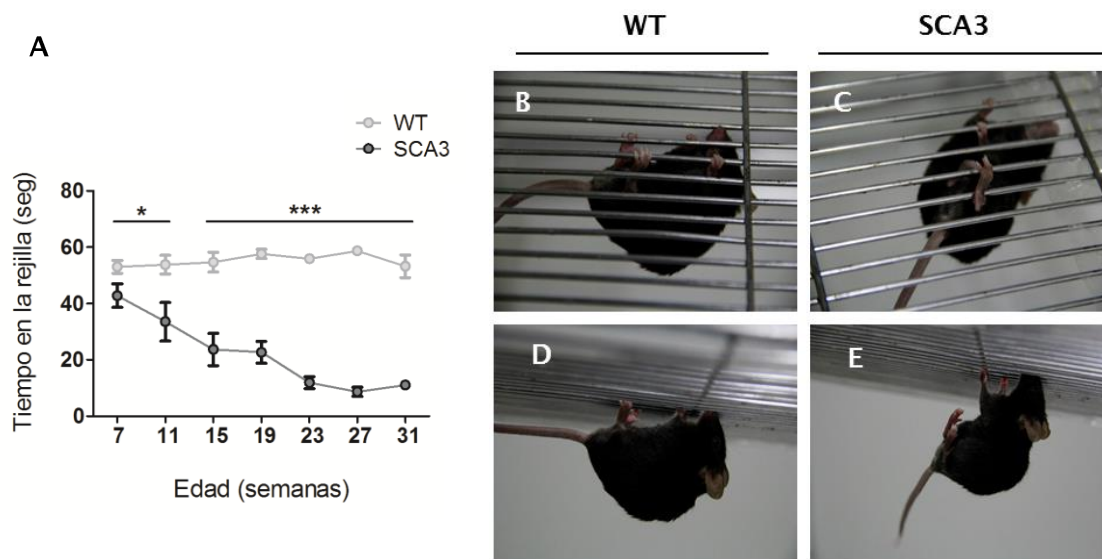


Figura 3. Análisis de la fuerza motora. En el panel A se muestra la evaluación motora en el test del *hanging wire* de los animales WT y SCA3. Los valores corresponden al tiempo que el animal permanece suspendido en la rejilla y se expresan como la media \pm SEM. En los paneles B-E se muestran imágenes representativas de la realización de la prueba para cada uno de los grupos experimentales: WT (B, D), SCA3 (C, E). La pérdida de fuerza motora en los animales SCA3 se observa primero como una incapacidad de agarrarse correctamente a la rejilla (C) y después como una incapacidad total de mantenerse sujeto (E). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para valores repetidos seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs control).

A partir de las 15 semanas de edad, los ratones transgénicos SCA3 comenzaron a desarrollar, además de alteraciones en la fuerza motora, alteraciones en el equilibrio, que se pudieron medir por las dificultades que los animales mostraron en la realización del test de la barra de equilibrio (Figura 4). La pérdida de equilibrio se asocia con un aumento del tiempo necesario para atravesar la barra, pero también con alteraciones en la postura que adoptan para realizar este test (Figura 4 B, C).

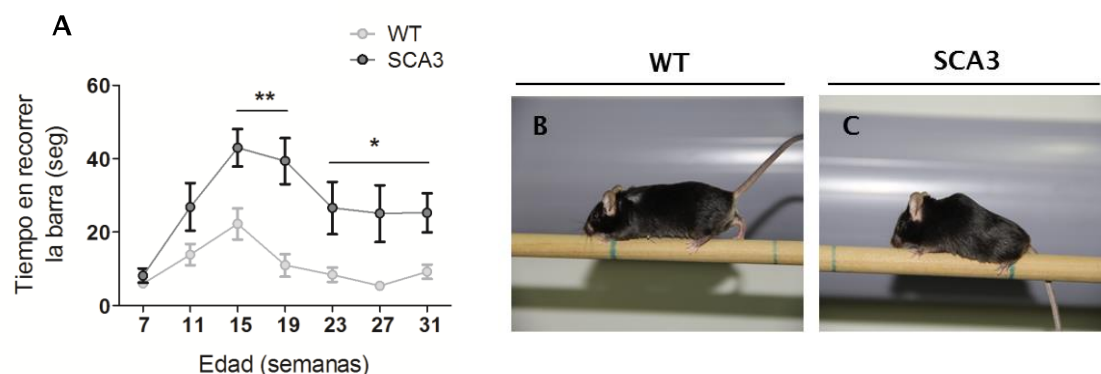


Figura 4. Análisis del equilibrio. En el panel A se muestra la evaluación del equilibrio en el test de la barra de equilibrio de los animales WT y transgénicos SCA3. Los valores se expresan como la media \pm SEM. En los paneles B y C se muestra una imagen representativa de la realización de la prueba para cada uno de los grupos experimentales: WT (B), SCA3 (C). Los datos representan el tiempo que el animal tarda en atravesar la barra. Posteriormente los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías para valores repetidos seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control). Diámetro de la barra 10mm.

A medida que progresa la enfermedad los animales SCA3 comienzan a presentar además alteraciones en la coordinación motora, que se pudieron cuantificar a través del análisis del tiempo de permanencia en el Rotarod. De forma particular, nuestros resultados mostraron que los animales transgénicos SCA3 ejecutaban de forma significativamente peor la prueba a partir de las 31 semanas de edad en comparación con los ratones *wildtype* (Figura 5).

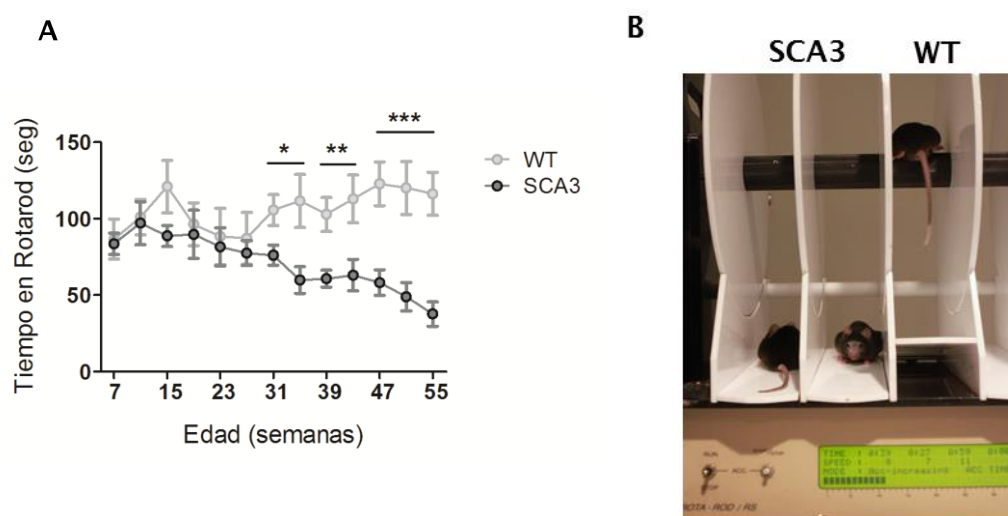


Figura 5. Análisis de la coordinación motora. En el panel A se muestra la evaluación de la coordinación motora de los ratones WT y SCA3 mediante el test del Rotarod. Los valores representan el tiempo de permanencia en el Rotarod y se expresan como la media \pm SEM. En B se muestra una imagen representativa del Rotarod durante una de las pruebas. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para valores repetidos seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

En los estadios más avanzados de la enfermedad (56 semanas de edad), el análisis de la pisada mediante el test de la huella o *footprinting* demostró que los animales transgénicos también presentan serios problemas en la marcha, con pasos más cortos y con una evidente pérdida de equilibrio (Figura 6 A). En este estadio de la enfermedad, además, el ratón transgénico presentaba un reflejo característico de ciertas enfermedades neurodegenerativas conocido como *clasp* (Figura 7). Este reflejo motor se ha relacionado con la distonía característica de los pacientes de SCA, y ya ha sido observado previamente en otros modelos de ratones transgénicos para la SCA3 (Gould, 2012).

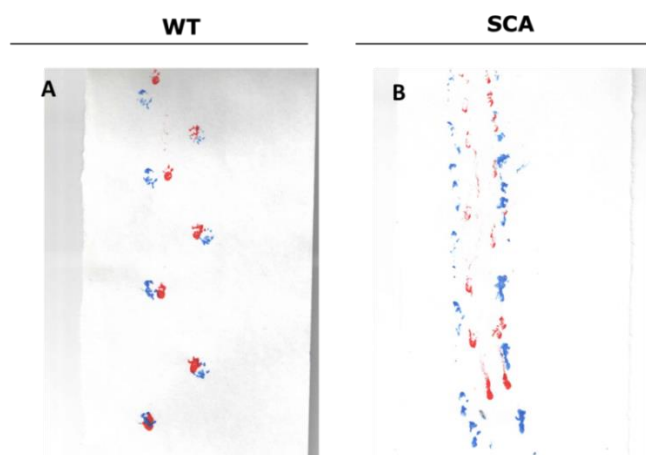


Figura 6. Análisis de la marcha de los ratones SCA3. Los ratones transgénicos SCA3 presentan significativas alteraciones en la marcha en comparación con los ratones control a las 56 semanas de edad.

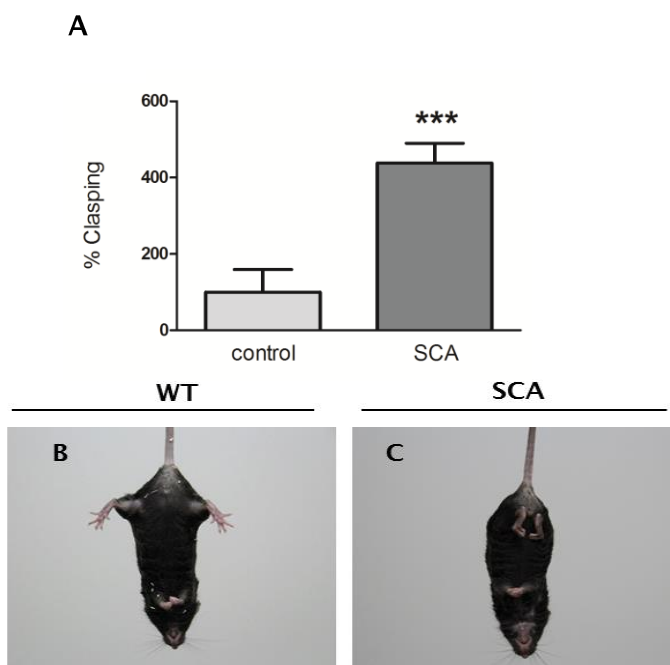


Figura 7. Presencia de clasp en los animales SCA3. A las 56 semanas de edad, los ratones transgénicos para la SCA3 presentaban distonía sostenida de las extremidades al suspender al animal por la cola: WT (A), SCA3 (B). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo de este reflejo (ver escala en Materiales y Métodos). Los valores se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de test de Student (***) $p < 0.001$ vs control).

Los resultados obtenidos en las distintas pruebas comportamentales demuestran una clara afectación a nivel motor en los animales SCA3 en comparación con los controles *wildtype*. Estas alteraciones eran bastante equiparables a las descritas previamente para este (Silva-Fernandes et al., 2014) y para otros modelos animales de esta enfermedad (Gould, 2012). La Figura 8 muestra un resumen de los diferentes síntomas observados en los ratones CMVMJD135. El análisis de estos resultados nos permitió establecer diferentes estadios en el progreso de la enfermedad en este modelo de SCA3: (i) una fase sintomática temprana (desde las 7 hasta las 15 semanas de edad), caracterizada principalmente por una disminución en la fuerza motora; (ii) una fase sintomática intermedia (desde las 16 a las 32 semanas de edad), caracterizada por presentar, además de un déficit en la fuerza motora, alteraciones en el equilibrio y (iii) una fase avanzada de la enfermedad (a partir de las 35 semanas de edad), en la que son evidentes otras alteraciones motoras, como descoordinación motora, alteraciones en la marcha o presencia de *claspings* (Figura 8).

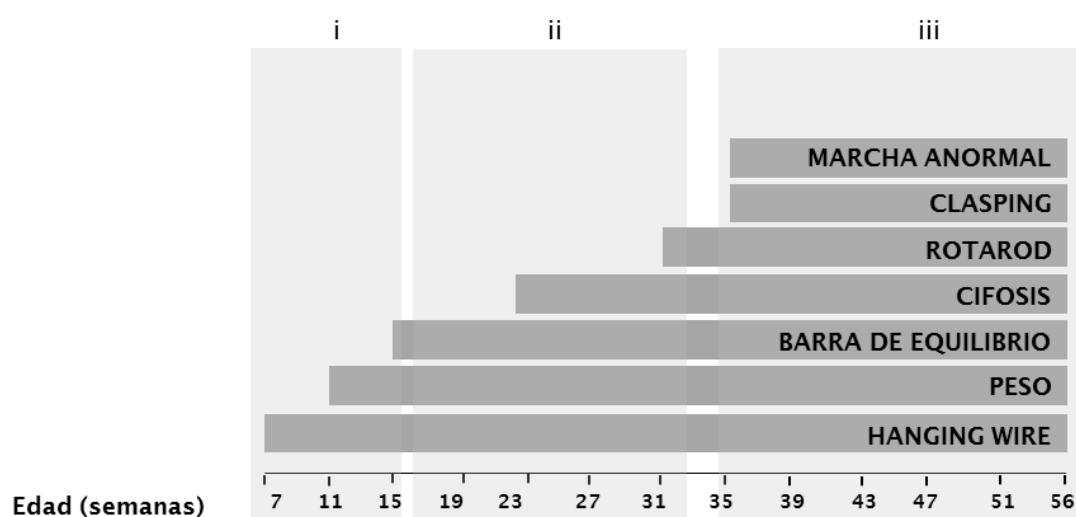


Figura 8. Esquema representativo de los principales síntomas durante el desarrollo de la enfermedad en el modelo de SCA3. La aparición de los síntomas motores se da de forma progresiva desde las 7 semanas de edad permitiendo distinguir tres etapas diferencias en el transcurso de la enfermedad: (i), fase temprana; (ii) fase intermedia; (iii), fase avanzada.

2.1.1.3. Actividad metabólica cerebral

Estudios previos en pacientes de SCA3 han mostrado la existencia de alteraciones a nivel del metabolismo en varias estructuras encefálicas relacionadas con la actividad y coordinación motora. Por ejemplo, mediante estudios funcionales de tomografía por emisión de positrones (PET) se ha demostrado la existencia de una reducción en el metabolismo de la glucosa en el cerebelo, tronco encefálico, estriado y corteza cerebral (Soong et al., 1997; Taniwaki et al., 1997). Para estudiar las posibles alteraciones de la actividad metabólica cerebral en el modelo de SCA3 se realizó un estudio PET utilizando como radiotrazador la ^{18}F -FDG, un análogo de la glucosa. Se eligieron dos edades representativas de la fase sintomática intermedia y avanzada (21 y a las 43 semanas de edad, respectivamente).

Los experimentos de imagen *in vivo* indicaron que a las 21 semanas de edad, a pesar de observarse alteraciones en la fuerza motora y equilibrio, la actividad metabólica encefálica parece ser similar en ambos genotipos (Figura 9). Sin embargo, en una etapa más avanzada de la enfermedad, cuando todos los síntomas motores que hemos estudiado eran ya evidentes (43 semanas de edad), los animales transgénicos presentaron una disminución en la actividad metabólica cerebral, cuantificada mediante un descenso en la captación de ^{18}F -FDG. Este descenso en la actividad metabólica se observó en todas las estructuras cerebrales estudiadas (corteza cerebral, caudado-putamen, tálamo, tronco encefálico y cerebelo) (

Figura 10). Estos resultados están en consonancia con lo descrito previamente para los pacientes de SCA3 (Soong et al., 1997; Taniwaki et al., 1997).

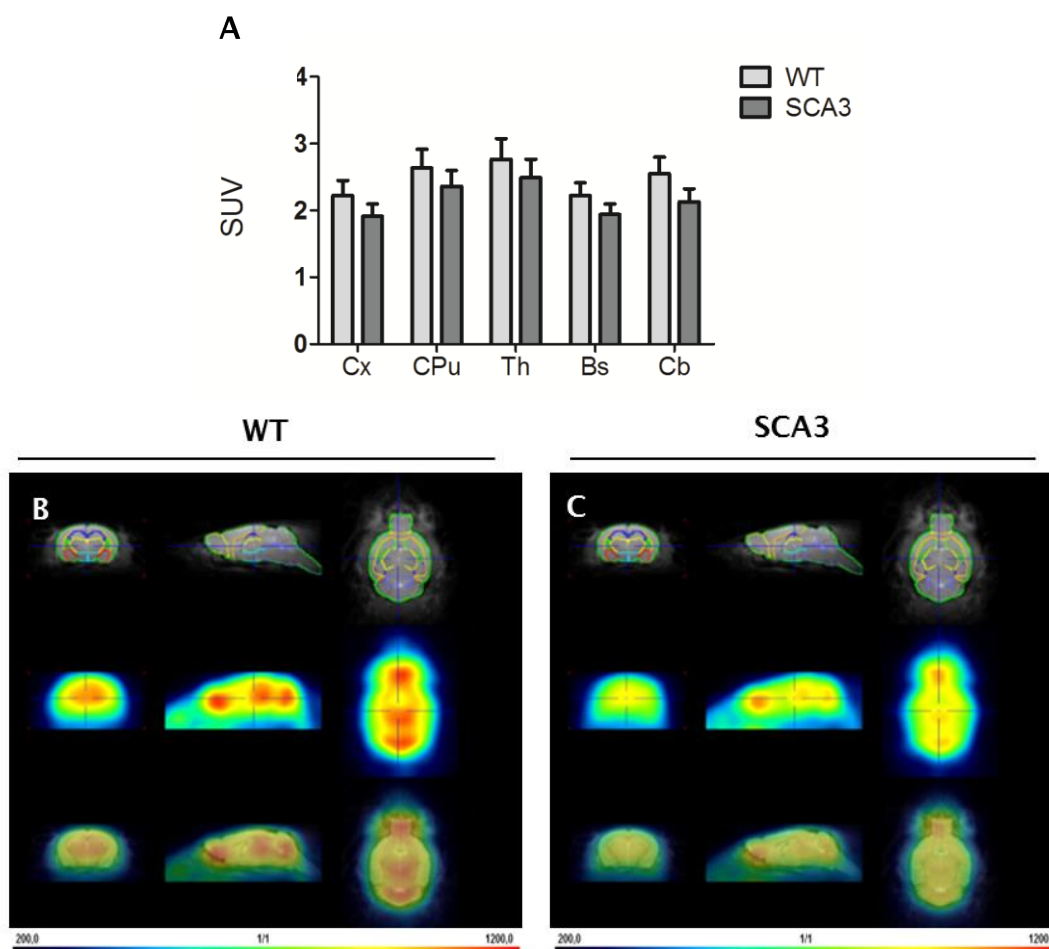


Figura 9. Análisis de la actividad metabólica cerebral a las 21 semanas de edad. Estudio PET para la ^{18}F -FDG en la fase intermedia de la enfermedad en ratones WT y transgénicos SCA3. En el panel A se muestra el análisis cuantitativo de esta prueba. Los valores se expresan como la media del SUV (valor de captación estándar) para cada grupo experimental \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un análisis de test de Student. Imágenes representativas de la acumulación de ^{18}F -FDG *in vivo* en el cerebro de animales WT (B) y SCA3 (C) a las 21 semanas de edad. Cx, corteza; CPu, caudado putamen; Th, tálamo; Bs, tronco encefálico; Cb, cerebelo.

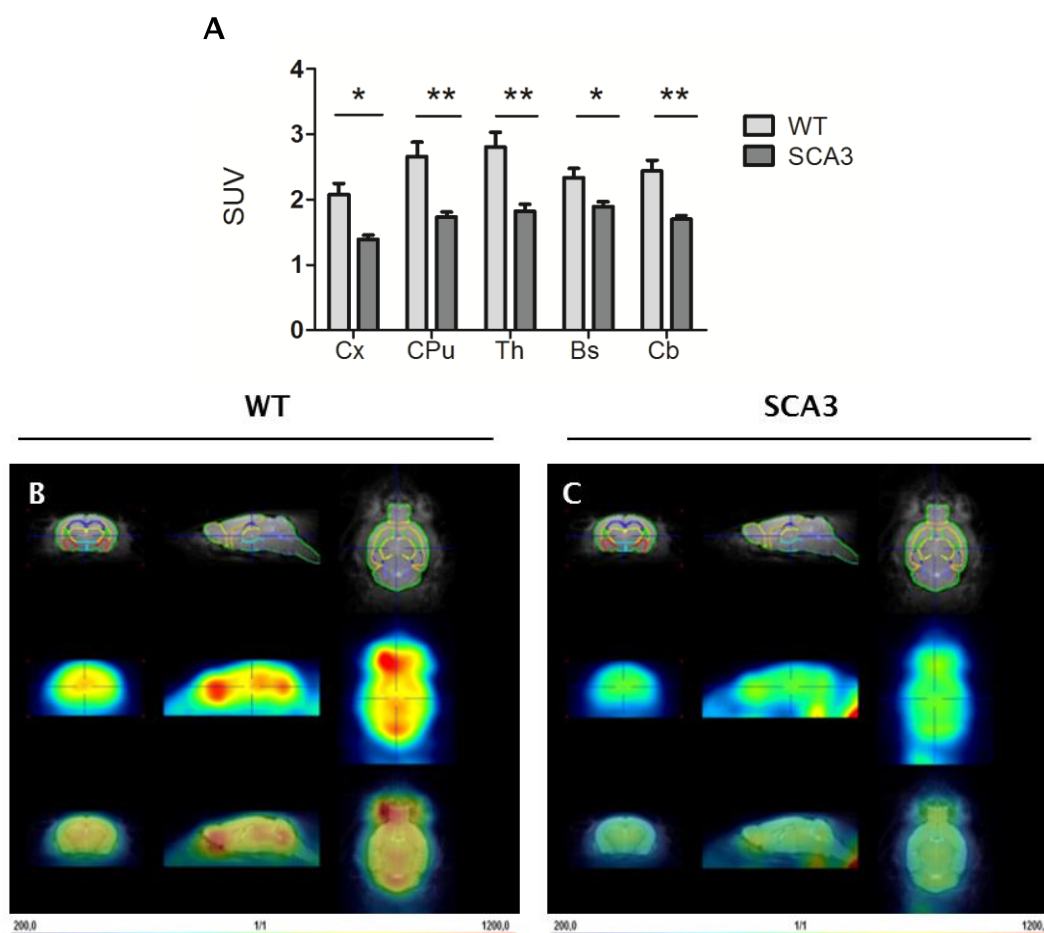


Figura 10. Análisis de la actividad metabólica cerebral de los ratones transgénicos SCA3. Estudio PET para la 18F-FDG en la fase avanzada de la enfermedad en ratones WT y transgénicos SCA3. En el panel A se muestra el análisis cuantitativo de esta prueba. Los valores se expresan como la media del SUV (valor de captación estándar) para cada grupo experimental \pm SEM. En el panel B y C se muestran imágenes representativas de la acumulación de 18F-FDG in vivo en el cerebro de animales WT (B) y SCA3 (C) a las 43 semanas de edad. Los datos se analizaron mediante un análisis de test de Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control). Cx, corteza; CPu, caudado putamen; Th, tálamo; Bs, tronco encefálico; Cb, cerebelo.

2.1.2. Análisis neuropatológico y bioquímico

A la vista de las alteraciones motoras que desarrollan los animales transgénicos SCA3 nos propusimos estudiar si estas alteraciones iban acompañadas de alteraciones neuropatológicas y/o bioquímicas que indicasen atrofia a nivel del cerebelo pero también de otras estructuras encefálicas. Para ello, se analizó el encéfalo de los animales transgénicos SCA3 en los tres estadios de la enfermedad (a las 16, 32 y 56 semanas de edad, respectivamente). Las regiones del encéfalo que se estudiaron fueron aquellas que se ha descrito que están más afectadas en la enfermedad: cerebelo, tronco encefálico y estriado (Klockgether et al., 1998; Koeppen, 2005; Murata et al., 1998; Riess et al., 2008; Taroni y DiDonato, 2004).

Los experimentos de *western-blot* con anticuerpos monoclonales específicos para la ataxina-3 y poliglutamina confirmaron la expresión de la proteína ataxina-3 humana mutada con una repetición de glutaminas en el cerebro de los animales transgénicos SCA3. En el caso de los animales control no se observó la banda correspondiente como se puede apreciar en la Figura 11.

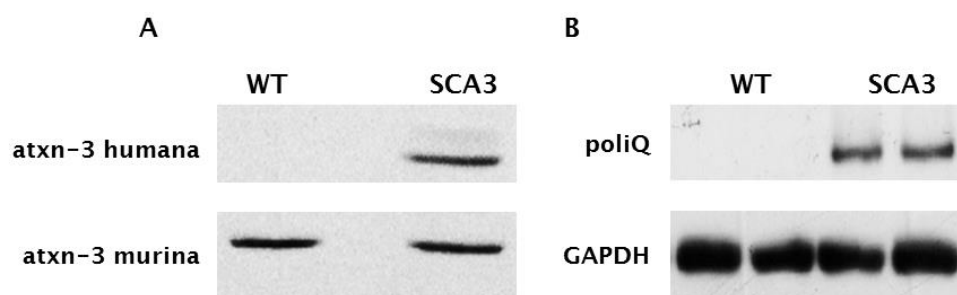


Figura 11. Western-blot para la proteína ataxina-3 con repeticiones de poliglutamina. En el cerebro de los animales transgénicos SCA3 se expresa la proteína mutada. Imagen representativa del *Western-blot* del cerebelo de ratones de 56 semanas de edad para los anticuerpos anti-ataxina-3 (A) y anti-poliglutamina, con su control de carga obtenido mediante el empleo de un anticuerpo anti-GAPDH (B).

2.1.2.1. Estudio de la degeneración neuronal

Como se ha comentado anteriormente, el cerebelo es la estructura cerebral que se ve principalmente afectada en la mayoría de las SCAs (Koeppen, 2005; Manto, 2005; Scherzed et al., 2012; Schulz et al., 2010). Por ello, el primer paso en este bloque de experimentos fue analizar los cambios que presentaba esta estructura encefálica durante la progresión de la enfermedad en el modelo transgénico de la SCA3.

Una de las características de las proteínas con expansiones de poliQ es la capacidad de agregarse dando lugar a la formación de inclusiones principalmente intranucleares. Estas inclusiones contienen diferentes componentes celulares como la ubiquitina, elementos del proteosoma o chaperonas, entre otros (Matilla-Dueñas et al., 2010; McCampbell et al., 2000). Los experimentos de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-ubiquitina en el tejido procedente de los ratones transgénicos SCA3 permitieron identificar las inclusiones intranucleares en las fases sintomáticas de la enfermedad, unos agregados que no se observaron en los animales *wildtype*. Los agregados intranucleares se localizaba en los ratones SCA3 en las neuronas de varios núcleos del tronco encefálico como son el núcleo pontino (Figura 12 A) y la oliva inferior (Figura 12 B). La presencia de inclusiones intranucleares en estas estructuras ha sido descrita previamente en pacientes con SCA3 y en modelos animales de esta enfermedad (Paulson et al., 1997).

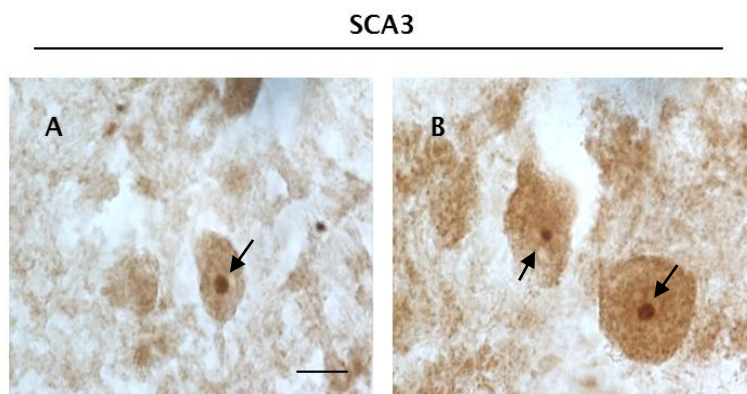


Figura 12. Inmunohistoquímica para ubiquitina. Se observa la presencia de agregados positivos para Ub en las neuronas de varios núcleos del tronco encefálico a las 56 semanas de edad: núcleo pontino (A) y oliva inferior (B). Escala de las barras: 20µm.

Por otro lado, nuestros datos no han mostrado la presencia de inclusiones nucleares en las células de Purkinje (datos no mostrados). Esta ausencia de inclusiones nucleares en las células de Purkinje es una característica común en esta, pero también en otras SCAs causadas por expansión de poliglutaminas (Koeppen, 2005; Taroni y DiDonato, 2004).

Cuando se analizó por inmunohistoquímica el marcador de células de Purkinje calbindina en la etapa más avanzada de la enfermedad (56 semanas de edad) no se observaron diferencias significativas entre los animales sanos y los ratones transgénicos SCA3, en cuanto a la morfología y número de las células de Purkinje (Figura 13). Estos datos están en consonancia con lo descrito previamente para la SCA3, donde las células de Purkinje están relativamente conservadas en comparación con lo observado para otras ataxias de herencia dominante (Koeppen, 2005).

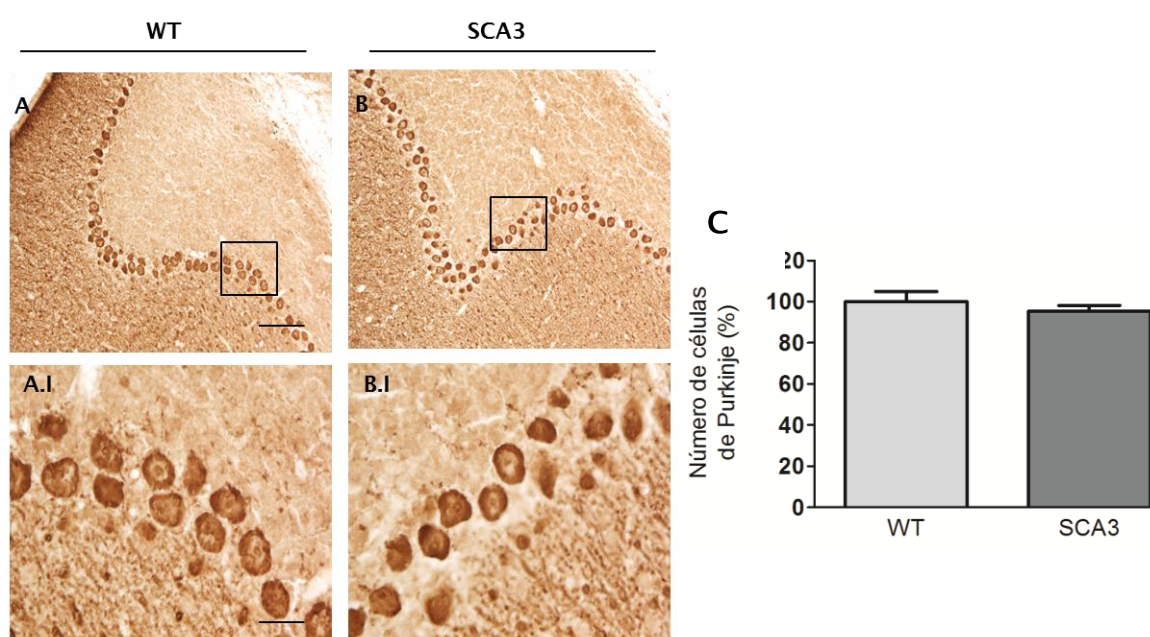


Figura 13. Inmunohistoquímica para el marcador neuronal calbindina en el cerebelo: células de Purkinje de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa una fuerte inmunorreactividad para la proteína calbindina en la corteza del cerebelo de los ratones WT (A) y transgénicos SCA3 (B). En el panel C se muestra el análisis cuantitativo del número de células de Purkinje marcadas positivamente con calbindina. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo experimental \pm SEM, posteriormente analizados mediante el test estadístico de t de Student.

En el núcleo dentado, se observó un ligero descenso en la densidad de fibras calbindina positivas y que podrían corresponder a los axones de las células de Purkinje que proyectan sobre este núcleo (Figura 14 A, B). Esta disminución en la expresión de calbindina en los terminales que alcanzan el núcleo dentado ya se ha visto previamente en el cerebelo de pacientes afectados por SCA3 y se ha relacionado con la degeneración grumosa característica de estas enfermedades (Koeppen et al., 2013).

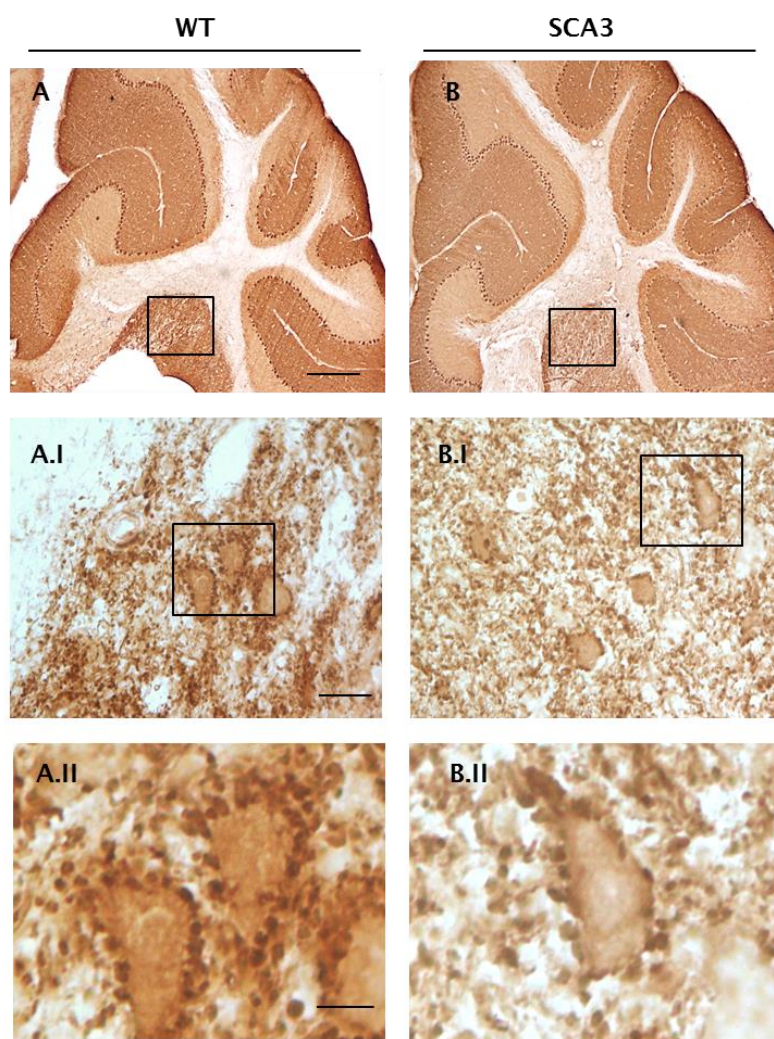


Figura 14. Inmunohistoquímica para el marcador neuronal calbindina en el cerebelo: núcleo dentado de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa un descenso en la expresión para la proteína calbindina en el núcleo dentado de los ratones SCA3 (B) en comparación con los controles (A). Nótese la pérdida de terminales calbindina positivos en el núcleo dentado de los ratones SCA3 en comparación con los controles (A.II, B.II).

También llevamos a cabo un análisis de los niveles de la proteína calbindina en el cerebelo de los animales SCA3 mediante *western-blot* en comparación con los animales *wildtype*. Como era de esperar, en base a la falta de cambios en las células de Purkinje y los pequeños efectos observados en las neuronas del núcleo dentado, no se encontraron diferencias significativas entre transgénicos y ratones *wildtype* aunque si se observó una cierta tendencia a disminuir en los animales transgénicos (Figura 15). Esta tendencia podría relejar la pérdida de terminales calbindina positivos en el núcleo dentado, pero no resulto fácil cuantificar esta inmunotinción por problemas metodológicos. Como alternativa nos propusimos analizar este núcleo mediante tinción de azul de metileno. Observamos que aparecían células con el cuerpo celular encogido y con el citoplasma basófilo en el núcleo dentado de los ratones SCA3 (Figura 16 A, B). Para determinar la magnitud de este hecho, se cuantificó el número de células en esta área cerebral y pudimos observar que el número de células en el núcleo dentado teñidas con azul de metileno de los animales transgénicos es claramente menor que en los controles (Figura 16 C).

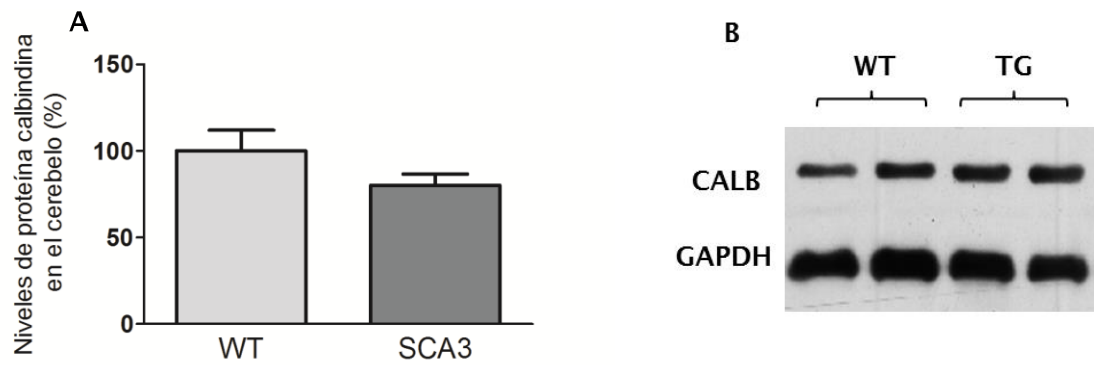


Figura 15. Western-blot para la proteína calbindina en el cerebelo de ratones SCA3 y *wildtype*. En el panel A se muestra el análisis cuantitativo del *western-blot* para el anticuerpo anti-calbindina en el cerebelo de ratones WT y transgénicos SCA3. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo experimental y se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Los datos fueron posteriormente analizados mediante un análisis de la *t* de Student. Imagen representativa del *western-blot* del cerebelo de ratones de 56 semanas de edad para los anticuerpos anti-calbindina y anti-GAPDH (B).

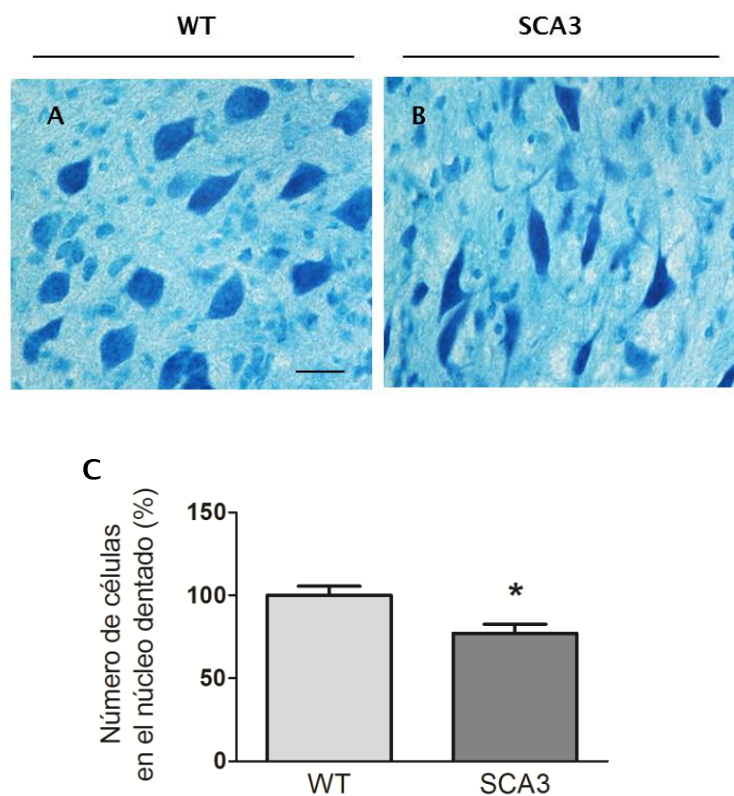


Figura 16. Tinción de azul de metileno en el núcleo dentado de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa atrofia de las neuronas del núcleo dentado de los animales SCA3 en comparación con los controles WT (A, B). En el panel C se muestra el análisis del número de células en este núcleo. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo y se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Los datos fueron posteriormente analizados mediante un análisis de la *t* de Student, (* $p < 0.05$ vs control). Escala de las barras: A-F 25 μ m.

En cuanto al tronco encefálico, la tinción de azul de metileno también permitió identificar alteraciones en la morfología de las células del núcleo pontino (Figura 17 A, B), en contraste con la apariencia normal de las células de la oliva inferior (Figura 17 C, D). La cuantificación del número de células en estos núcleos corroboró nuestras observaciones demostrando un descenso significativo en el número de células en el núcleo pontino pero no en la oliva inferior (Figura 17 E). La atrofia específica del núcleo pontino está en concordancia con lo descrito previamente para la SCA3 (Koeppen, 2005; Koeppen et al., 2013).

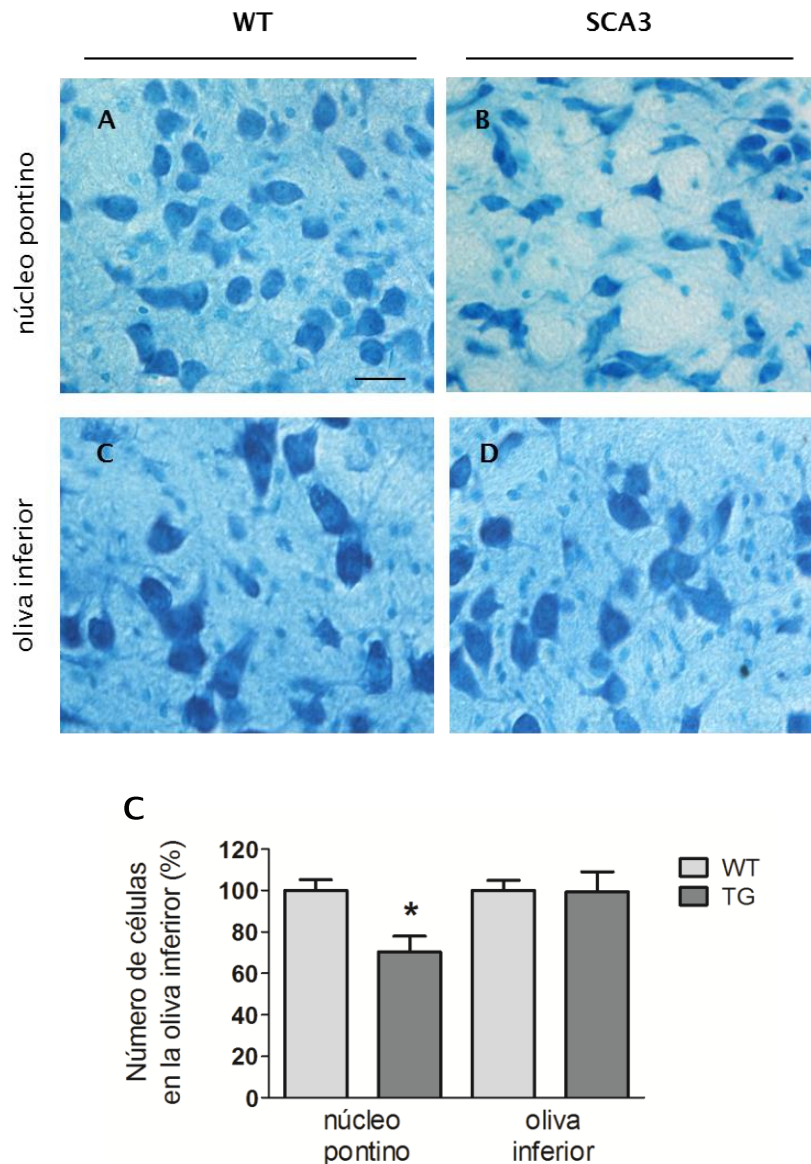


Figura 17. Tinción de azul de metileno en el tronco encefálico de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa atrofia de las neuronas del núcleo pontino en los ratones transgénicos SCA3 (B) en comparación con los controles (A). No se observa en cambio diferencias en la morfología de las neuronas de la oliva inferior de animales WT (C) y SCA3 (D). En el panel E se muestra el análisis cuantitativo del número de células en ambas estructuras cerebrales. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo y se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Los datos fueron posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, (* $p < 0.05$ vs control). Escala de las barras: A-F 25 μ m.

En relación al análisis histológico de la otra estructura encefálica analizada, el estriado, nuestros datos evidenciaron una pérdida de células también en esta estructura cerebral y las células supervivientes además presentaba signos de afectación con un cuerpo celular en general reducido (Figura 18).

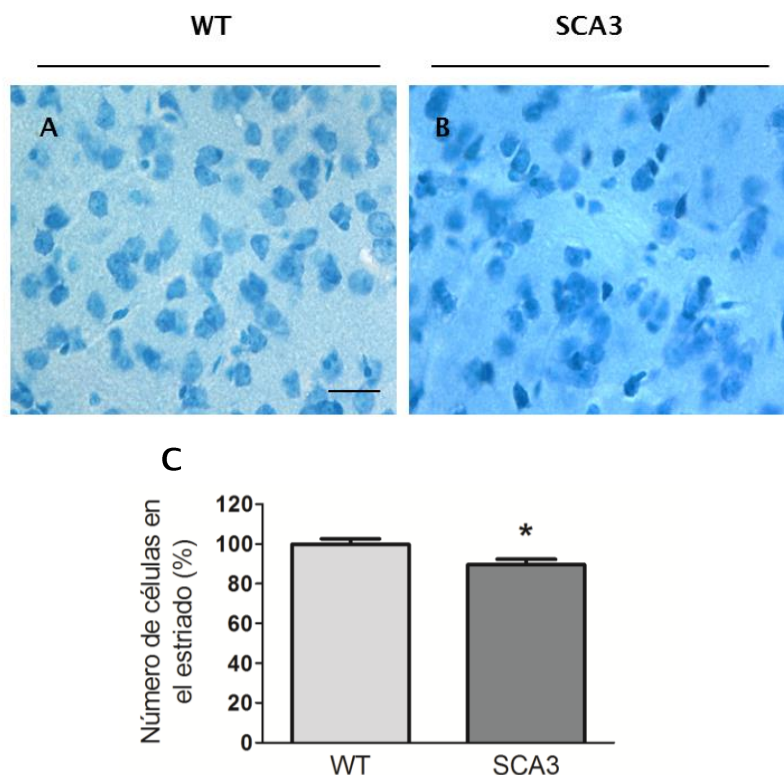


Figura 18. Tinción de azul de metileno en el estriado de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa atrofia de las neuronas del estriado en los animales SCA3 en relación a los controles (A, B). En el panel C se muestra el análisis del número de células en esta estructura cerebral. Los datos corresponden a la media de 5 casos por grupo y se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Los datos fueron posteriormente analizados mediante un análisis de la t de Student, (* $p < 0.05$). Escala de las barras: A-F 25 μ m.

En resumen, nuestros resultados han demostrado que hay degeneración de subpoblaciones neuronales específicas en las estructuras cerebrales que se ven afectadas en el transcurso de la enfermedad. En particular, nuestros datos han demostrado que hay atrofia neuronal en el núcleo dentado del cerebelo y en el núcleo pontino del tronco encefálico. También se observa atrofia y muerte neuronal en el estriado. Es importante remarcar que en estas regiones encefálicas se ha visto también atrofia neuronal en el caso de pacientes afectados por la enfermedad (Koeppen, 2005; Riess et al., 2008; Taroni y DiDonato, 2004).

Como una medida adicional del grado de degeneración se analizó la expresión del ARN mensajero para los marcadores neuronales calbindina (marcador de células de Purkinje) y NSE (proteína citoplasmática que se encuentra en algunos tipos de neuronas, entre ellas las neuronas del núcleo dentado (Nogami et al., 1998). Como se puede observar en las gráficas de la Figura 19 E los niveles de expresión del ARNm para la calbindina mostraron un descenso en esa proteína en el estriado de los animales enfermos a partir de las 32 semanas de edad, no se observaron

cambios en las otras dos estructuras cerebrales estudiadas (el cerebelo y tronco encefálico) (Figura 19 A, C). En el caso de la NSE no se observaron diferencias entre los animales *wildtype* y los transgénicos para este marcador en ninguna de las estructuras cerebrales y edades estudiadas (Figura 19 B, D y F).

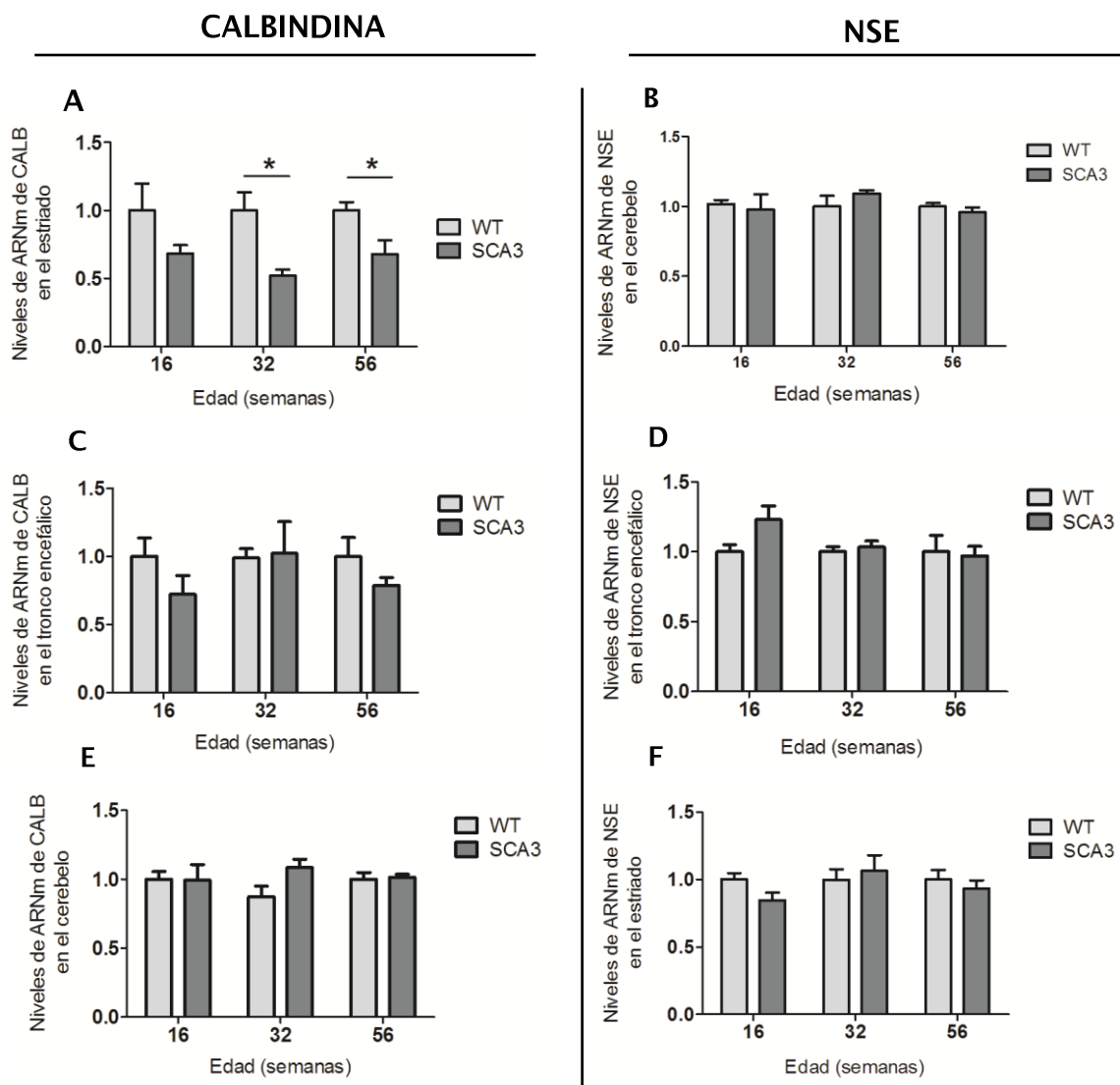


Figura 19. Análisis de la expresión del ARNm de los marcadores neuronales CALB y NSE de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión de los marcadores neuronales calbindina (A, C, E) y NSE (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras encefálicas de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs control).

Para determinar si el descenso en la expresión de calbindina se debía a una pérdida en la subpoblación de neuronas de proyección estriatal llamadas MSN (del inglés *medium spiny neuron*) y que son las neuronas mayoritarias del estriado, se analizó el marcador específico DARPP-32 (fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc). Esta proteína es un regulador de la señalización del receptor de dopamina que ya se ha demostrado previamente que está reducido en el estriado de modelos animales de la SCA3 (Alves et al., 2008). Nuestros datos muestran un descenso significativo en los niveles de ARNm para esta proteína a la edad de 56 semanas (Figura 20).

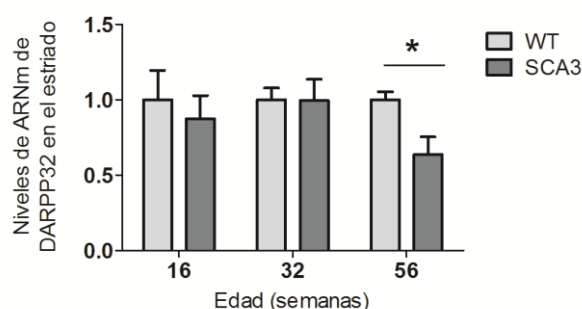


Figura 20. Análisis de la expresión del ARNm del marcador neuronal DARPP32 en el estriado de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$).

Por otro lado, se analizó la expresión del factor de crecimiento BDNF como posible marcador de daño neuronal. El BDNF es una neurotrofina implicada en el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las neuronas maduras en el SNC y periférico (Sofroniew et al., 2001). Además, BDNF puede regular la activación astrogliar y las reacciones inflamatorias que aparecen en condiciones patológicas (Connor y Dragunow, 1998; Ebadi et al., 1997). En este sentido, existen evidencias que sugieren que alteraciones en los niveles de BDNF podrían contribuir a la etiología de diferentes enfermedades neurodegenerativas como son las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington (Connor y Dragunow, 1998; Siegel y Chauhan, 2000). Estudios previos han demostrado un descenso en los niveles de ARNm para BDNF en modelos celulares y en tejido *post mortem* de pacientes afectados de SCA3 (Evert et al., 2003). Sin embargo, nuestros resultados no muestran ninguna variación en los niveles de esta neurotrofina en los animales transgénicos SCA3 en relación a los animales *wildtype* en ninguna de las estructuras y edades estudiadas (Figura 21).

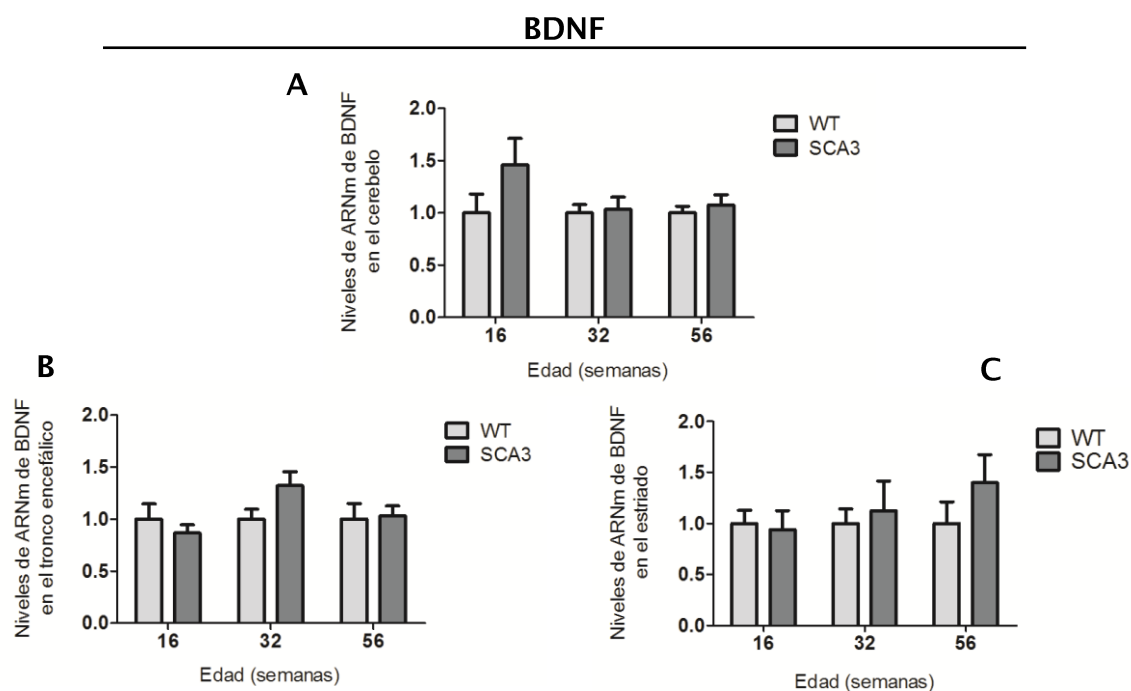


Figura 21. Análisis de la expresión del ARNm del factor neurotrófico BDNF de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos representan la media de seis casos por grupo experimental normalizados respecto al valor medio del grupo control \pm SEM: cerebelo (A), tronco encefálico (B) y estriado (C). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls.

2.1.2.2. Estudio de la respuesta glial

Se ha descrito que ante el deterioro del tejido nervioso en las enfermedades neurodegenerativas la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada” (Raivich et al., 1999). Este proceso es fundamental para limitar las áreas de daño y recuperar la actividad neuronal. El rasgo distintivo de la gliosis reactiva es el aumento en el número de astrocitos y la hipertrofia de sus procesos celulares. Además, estas células se caracterizan por la sobreexpresión de algunas proteínas del filamento intermedio como la proteína GFAP (Eddleston y Mucke, 1993). En la gliosis reactiva también se observa un incremento en el número de células de microglía. Morfológicamente la microglía reactiva transforma su fenotipo de forma ramificada a una forma más redondeada o ameboides, parecida a la morfología de los macrófagos. Esto se traduce en un incremento en el tamaño del cuerpo celular, el engrosamiento de las ramificaciones proximales y una disminución de las ramificaciones distales (Streit et al., 1999).

Estudios previos sobre tejidos *post mortem* de cerebro de pacientes afectados de SCA3 o de otras SCAs, incluido nuestro estudio en el diseño experimental I, han demostrado que a menudo la degeneración va acompañada de procesos de gliosis también en estas enfermedades. Sin embargo, es importante indicar también que estos procesos también pueden estar ausentes en regiones con una elevada degeneración (Evert et al., 2001; Rüb et al., 2013). Para determinar si existía activación glial en los animales transgénicos se realizaron estudios inmunohistoquímicos con dos marcadores específicos: GFAP (marcador de astrocitos) e Iba-1 (marcador de microglía).

Los experimentos para el marcador de astrocitos GFAP mostraron un patrón de expresión para los animales SCA3 similar al observado en controles (datos no mostrados). En cuanto a las células de microglía, los estudios de inmunohistoquímica con Iba-1 revelaron la presencia de células en estado inactivo distribuidas por todo el parénquima encefálico en la etapa temprana e intermedia de la enfermedad, tanto en los ratones transgénicos como en los *wildtype*, esto es células con un cuerpo celular pequeño y con prolongaciones largas y finas (datos no mostrados). El análisis del encéfalo de los animales en la etapa más avanzada de la enfermedad (56 semanas de edad) no reveló diferencias en el número de células Iba-1 positivas. Sin embargo, si se observó a esta edad una ligera activación de la microglía en áreas específicas del encéfalo de los animales SCA3. Esta activación se observó principalmente en el cerebelo, concretamente en el núcleo dentado (Figura 22). Esta microglía activada presentaba un incremento moderado en el tamaño del cuerpo celular y un acortamiento de sus procesos en comparación con las células de microglía de los animales *wildtype* (ver detalles en la Figura 22). Nuestros resultados también mostraban una leve activación microglial en el núcleo pontino, pero no en el estriado (Figura 23).

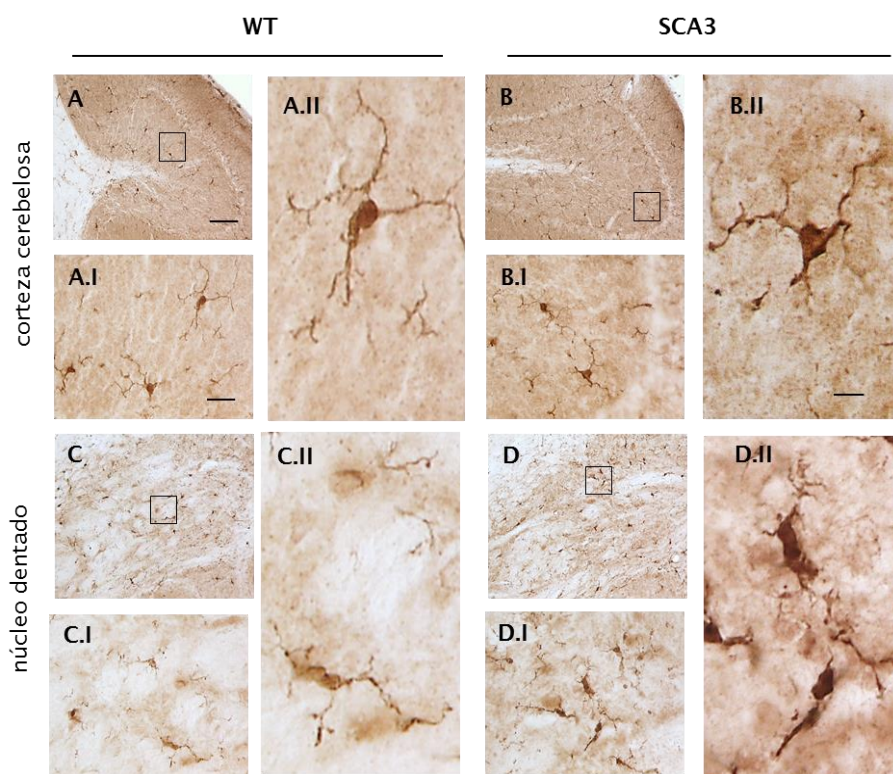


Figura 22. Inmunohistoquímica para el marcador de microglía Iba-1 en el cerebelo de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa la presencia de células microgliales dispersas por todo el cerebelo en los ratones WT (A, C) y SCA3 (B, D): corteza cerebelosa (A, B) y núcleo dentado (C, D). Nótese la morfología de microglía activada en el núcleo dentado de los ratones SCA3 (D.II) en comparación con la microglía residente presente en los animales WT (C). Escala de las barras 200µm, detalle I 50µm y detalle II 10µm.

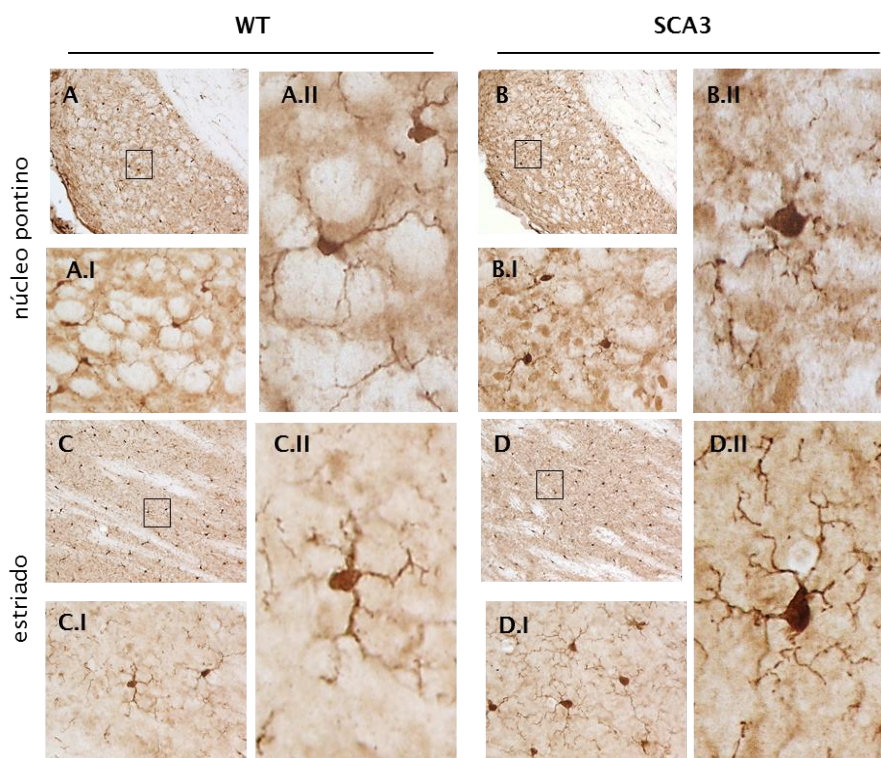


Figura 23. Inmunohistoquímica para el marcador de microglía Iba-1 en el núcleo pontino y estriado de ratones SCA3 y *wildtype*. Se observa la presencia de células microgliales en los ratones WT (A, C) y SCA3 (B, D): núcleo pontino (A, B) y estriado (C, D). Nótese la morfología ameboides de las células de microglía en el núcleo pontino de los ratones SCA3 (B.II) en comparación con la microglía presente en los animales WT (A.II). Escala de las barras 200µm, detalle I 50µm y detalle II 10µm.

En términos de cambios funcionales, la glía reactiva es capaz de liberar diferentes tipos de mediadores celulares como factores de crecimiento o citoquinas pro- o antiinflamatorias, entre otros (Raivich et al., 1999). Datos previos han descrito un incremento en la expresión de varios genes de citoquinas proinflamatorias en el encéfalo de pacientes de SCA3. Por ejemplo, se ha observado un incremento en la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en las neuronas que degeneran en la enfermedad, en el núcleo dentado y en el núcleo pontino (Evert et al., 2001, 2003, 2006). Por ello, paralelamente a los experimentos de inmunohistoquímica, se estudió el grado de inflamación en el cerebro de los animales SCA3 mediante el análisis del nivel de ARNm de genes involucrados en los procesos inflamatorios como son la IL-1 β y el TNF- α . En la Figura 24 se recogen los resultados del análisis mediante RT-PCR en el cerebelo, tronco encefálico y estriado de animales transgénicos y control. Las únicas diferencias se encontraron en el tronco encefálico, en la etapa más avanzada de la enfermedad. Estas diferencias se dan en la citoquina proinflamatoria TNF- α , la cual está incrementada en los animales enfermos (Figura 24 D). No se observaron cambios en la expresión del ARNm de IL-1 β en ninguna de las edades y áreas estudiadas (Figura 24 A, C y E). Estos datos están en consonancia con la pobre gliosis observada en los experimentos de inmunohistoquímica en el encéfalo de los ratones SCA3.

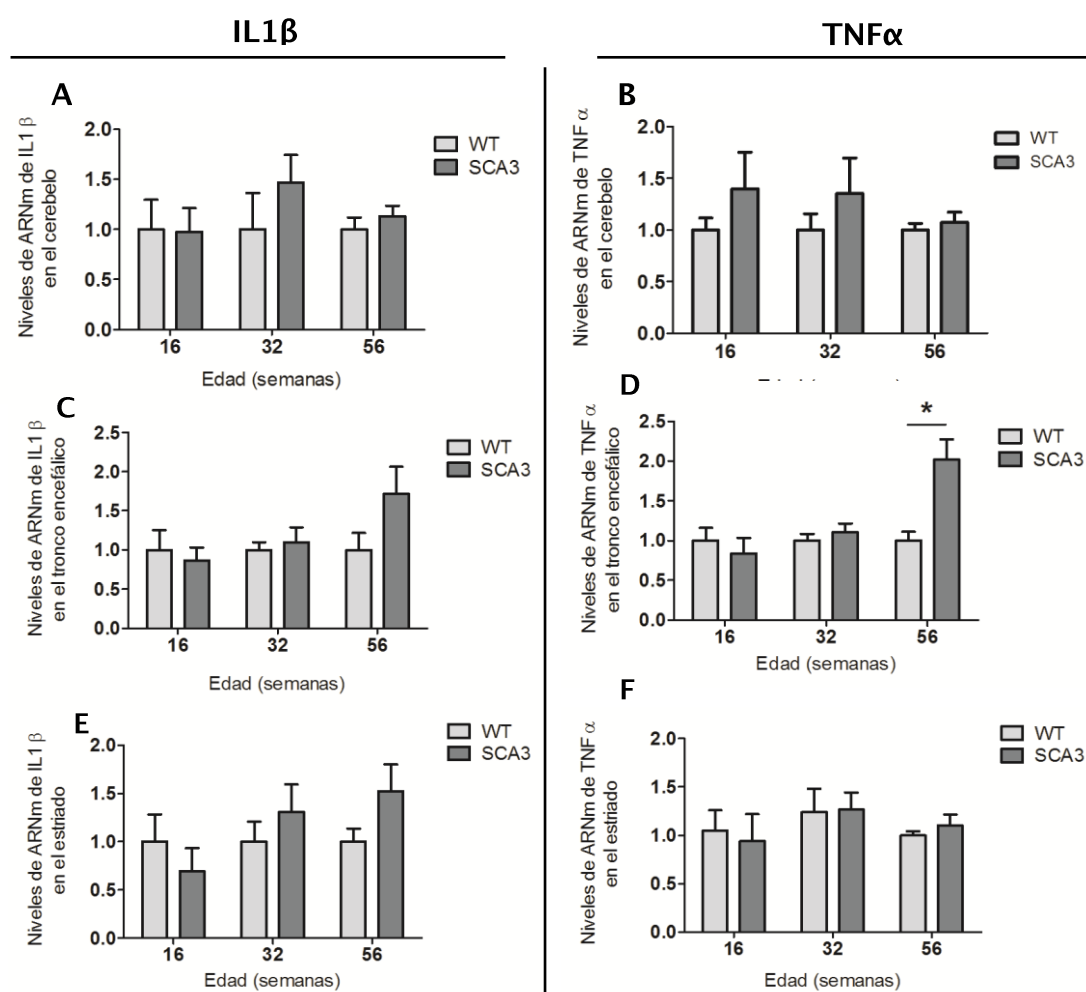


Figura 24. Análisis de la expresión del ARNm de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β (A, C, E) y TNF- α (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (*p<0.05 vs control).

2.1.2.3. Análisis de la recaptación de glutamato

La liberación excesiva de glutamato en el espacio sináptico constituye un mecanismo patogénico común en las SCAs (Chou et al., 2008; Custer et al., 2006; Liu et al., 2009; Serra et al., 2004) como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas crónicamente progresivas (Schaeffer y Duplantier, 2010). La eliminación del exceso de glutamato, en condiciones normales, está garantizada por un sistema de recaptación de glutamato presente en los astrocitos, los transportadores de glutamato: GLAST y GLT-1 (Danbolt, 2001; O'Shea, 2002). El transportador GLAST se expresa de forma muy abundante en el cerebelo, en la glía de Bergmann (Balderas et al., 2014). Un descenso en la expresión de este transportador podría estar relacionado con mayor daño excitotóxico como se ha visto previamente en la SCA1 y la SCA7 que, como la SCA3, son poliglutaminopatías (Custer et al., 2006; Cvetanovic, 2015). Por ello, nos propusimos también estudiar la expresión de los transportadores de glutamato gliales GLAST y GLT1 en el encéfalo de los ratones SCA3 (Figura 25).

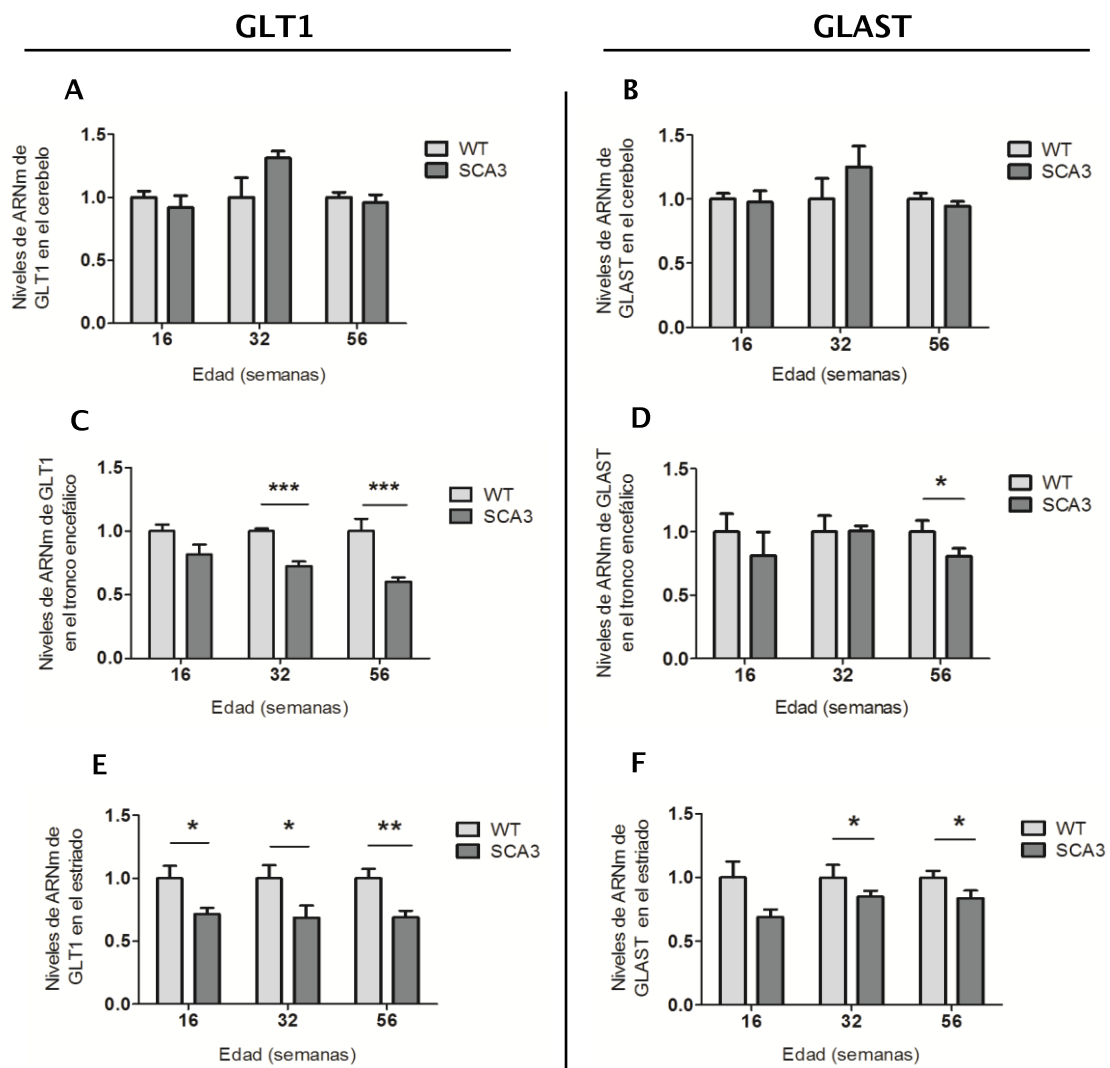


Figura 25. Análisis de la expresión del ARNm de los transportadores de glutamato GLT1 y GLAST de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión de los transportadores de glutamato gliales GLT1 (A, C, E) y GLAST (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p > 0.001$ vs control).

Mientras que en el cerebelo no se encontraron cambios en la expresión del ARNm de estos dos transportadores (Figura 25 A, B), sí que se observaron cambios en el tronco encefálico, donde hay un acusado descenso en los niveles del transportador GLT1 desde la fase sintomática intermedia (32 semanas de edad) (Figura 25 C) y de GLAST en la fase más avanzada de la enfermedad (56 semanas de edad) (Figura 25 D). En el estriado se observó un descenso significativo tanto en los niveles de GLT1 a partir de las 16 semanas de edad (Figura 25 E), como de GLAST desde las 32 semanas de edad (Figura 25 F). Estas observaciones podrían indicar la existencia de niveles anormalmente elevados de glutamato a nivel sináptico tanto en el núcleo pontino del tronco encefálico como en el estriado, lo que estaría en concordancia con los procesos de excitotoxicidad observados en otros modelos de SCA3 (Chou et al., 2008) y explicar la afectación importante de estructuras extracerebelares que se da en la SCA3 (Seidel et al., 2012).

2.2. ANÁLISIS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Los estudios llevados a cabo en el capítulo anterior proporcionan evidencias suficientes para establecer que los ratones transgénicos CMVMJD135 desarrollan un fenotipo equiparable en muchos aspectos al observado en los pacientes afectados por la SCA3. Este modelo presenta una progresión relativamente lenta de la enfermedad y una vida media de más de un año. Desde un punto de vista neuropatológico, los animales SCA3 se caracterizan por la degeneración de las células del núcleo dentado, núcleo pontino y estriado. Una degeneración que no parece estar asociada a procesos de inflamación. Si se han observado alteraciones tempranas en la expresión de los transportadores de glutamato, que podrían estar directamente implicadas en los procesos de excitotoxicidad observados en la SCA3 (Chou et al., 2008). Todo esto sugiere que este modelo animal puede ser bueno para el estudio de la progresión de la enfermedad y, en nuestro caso, sobre todo puede resultar útil para estudiar los posibles cambios que se dan en el SCE durante la aparición y progreso de los síntomas en la SCA3, de forma que se puede determinar su contribución en la patogénesis, y también la posibilidad de identificar dianas para tratamientos neuroprotectores.

Una vez caracterizada la progresión del fenotipo no patológico (alteraciones motoras, neurodegeneración, cambios moleculares) que se da en el modelo animal, y a la vista de los cambios observados en algunos elementos del SCE en el cerebelo *post mortem* procedente de pacientes enfermos de SCA quisimos estudiar este sistema de señalización en el encéfalo de los animales transgénicos para la SCA3. En particular quisimos centrarnos en el análisis la expresión de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y las enzimas implicadas en el metabolismo de endocannabinoides: las enzimas de degradación FAAH y MAGL y las enzimas de síntesis de estos ligandos, NAPE-PLD y DAGL. También se midieron los niveles de los propios ligandos endocannabinoides en concreto se analizó la AEA y otras dos *N*-aciletanolaminas relacionadas, la PEA y la OEA y, se midieron también los niveles de 2-AG y su análogo estructural el 2-OG. Estos análisis se realizaron en las tres áreas cerebrales en las que hemos observado

degeneración neuronal, en concreto, se estudió el cerebelo, el núcleo pontino del tronco encefálico y el estriado.

2.2.1. Receptores cannabinoides CB₁ y CB₂

El análisis mediante RT-PCR de la expresión de los genes que codifican para los receptores CB₁ y CB₂ demostró que existe un descenso significativo en los niveles de ARNm del receptor CB₁ en el estriado de los animales transgénicos en comparación con los *wildtype* (Figura 26 E). Este descenso se observó en la fase intermedia de la enfermedad (32 semanas de edad) y se mantuvo en la fase avanzada (56 semanas). No se observaron cambios en el ARNm de este receptor en las otras áreas cerebrales analizadas (cerebelo y tronco encefálico) (Figura 26 A, C).

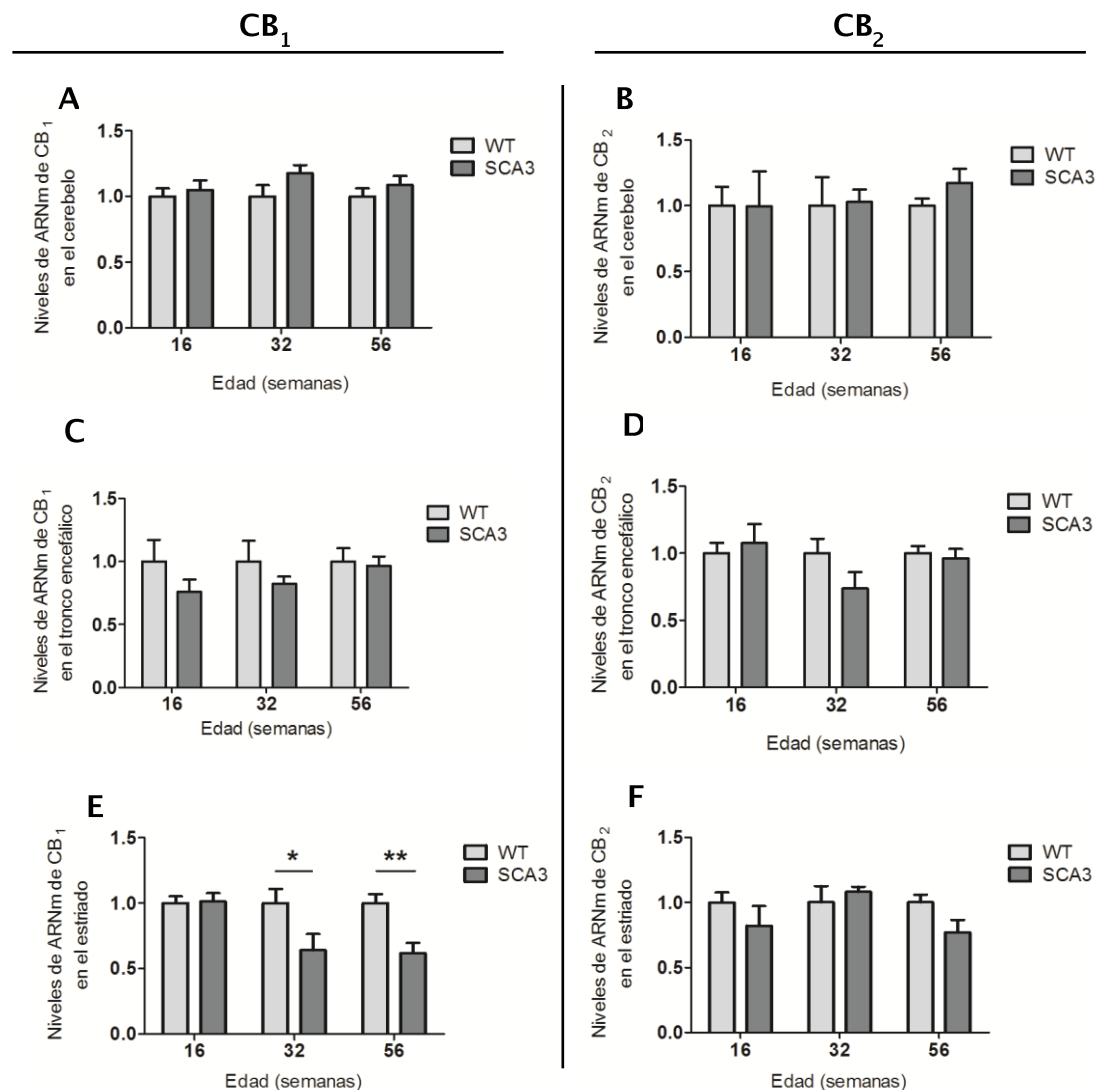


Figura 26. Análisis de la expresión del ARNm de los receptores CB₁ y CB₂ de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión del receptor CB₁ (A, C, E) y CB₂ (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs control) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control).

Es importante destacar que un descenso equivalente en el receptor CB₁ en el estriado se ha visto también en otra enfermedad causada por la presencia de proteínas con expansión de poliQs como es la enfermedad de Huntington (Scotter et al., 2010), y en el caso de la SCA3, este descenso de los niveles de expresión del receptor CB₁ sería compatible con la aparente pérdida de neuronas de proyección estriatal (en las que estaría localizado) tal y como reflejan los datos de tinción con azul de metileno (Figura 18) y expresión de calbindina (Figura 19) y de DARPP32 (Figura 20) que han sido comentados anteriormente. Por otro lado, el análisis de los niveles del ARNm para el receptor CB₂ en los animales transgénicos SCA3 no mostró diferencias en ninguna de las regiones y edades estudiadas (Figura 26 B, D y F).

Para profundizar en el estudio de los efectos que produce el descenso de ARNm para el receptor CB₁ en la señalización endocannabinoide, se llevaron a cabo una serie de análisis complementarios para caracterizar los posibles cambios que se dan, a nivel de la expresión de la proteína, durante el transcurso de la enfermedad. Como ya se mencionó con anterioridad, el cerebelo es una de las regiones encefálicas donde más abundantemente se expresa el receptor CB₁ (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998). En nuestros estudios hemos observado este receptor cannabinoide en la corteza cerebelosa de los animales *wildtype*, en particular el receptor CB₁ se localizó en las fibras paralelas de la capa molecular y en la capa granular. En la capa de células de Purkinje, se observó inmunotinción para el receptor CB₁ en las formaciones tipo pincel, que pertenecen a los terminales de las células en cesto que sinaptan con el soma de las células de Purkinje (Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998). En el núcleo dentado, también se observa señal para el receptor CB₁ en las neuronas de proyección y en las fibras que rodean a estas células.

En los ratones SCA3, en las edades más tempranas de la enfermedad (16 y 32 semanas), se observó un patrón de expresión para el receptor CB₁ similar al observado en controles (Figura 27 y Figura 28 respectivamente). Sin embargo, en la fase avanzada, a las 56 semanas de edad, se observó un evidente aumento de expresión para el receptor CB₁ en la corteza cerebelosa, en las formaciones tipo pincel (Figura 29 A-D). Por el contrario, en el núcleo dentado, las neuronas se marcan moderadamente, en comparación con la fuerte inmunotinción que presentan los animales *wildtype* (Figura 29 G, H), probablemente debido a la pérdida de fibras y a la degeneración de esta estructura tal y como se ha observado previamente.

La cuantificación mediante *western-blot* de los niveles de proteína confirmó el aumento de expresión del receptor CB₁ en el cerebelo de los ratones transgénicos SCA3 comparados con los animales *wildtype* a las 56 semanas de edad (Figura 30). Este aumento en la expresión del receptor CB₁ en el cerebelo está de acuerdo con los datos mostrados con anterioridad respecto al análisis del cerebelo *post mortem* de pacientes afectados por algún tipo de SCA.

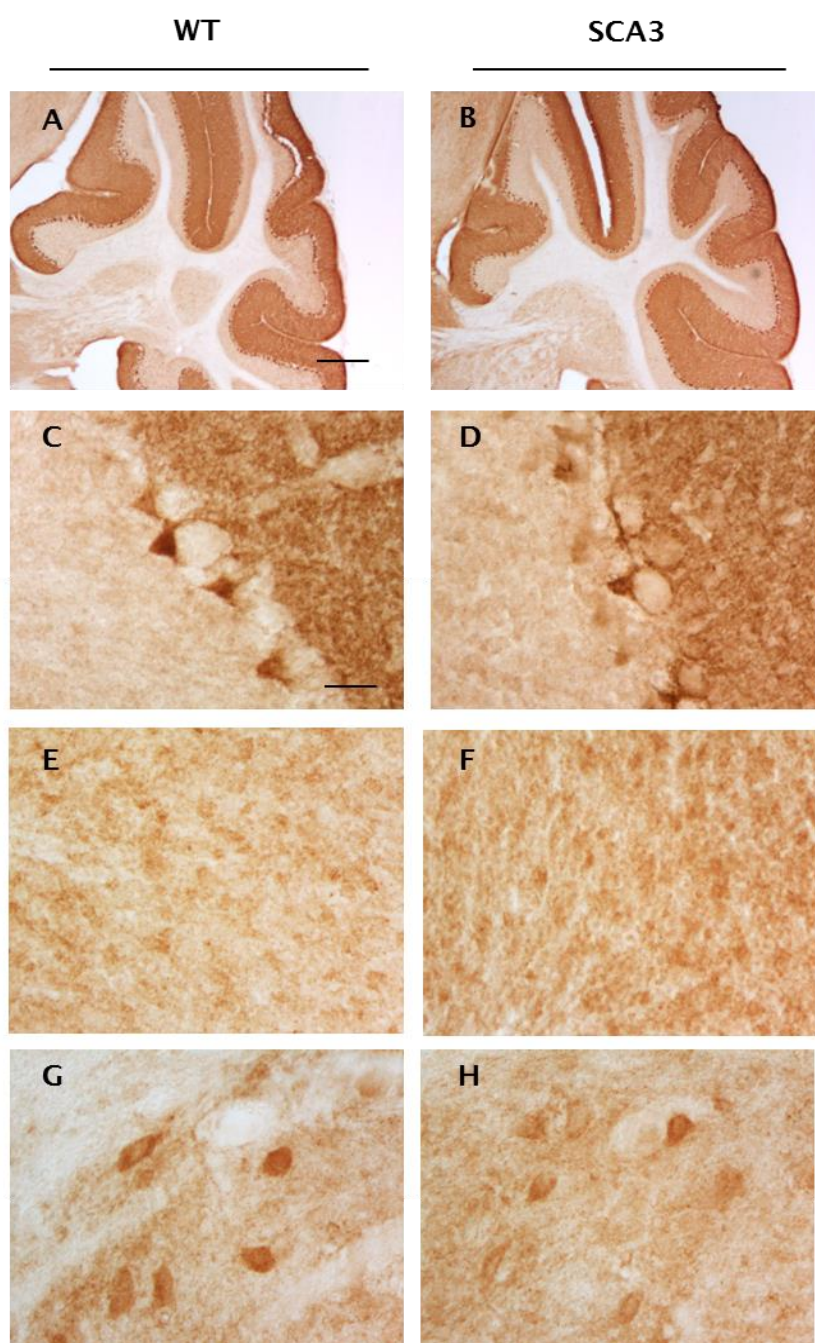


Figura 27. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en el cerebelo a las 16 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el cerebelo de ratones WT (A, C, E, G) y SCA3 (B, D, F, H): corteza cerebelosa (A, B); capa de células de Purkinje (C, D); capa granular (E, F); núcleo dentado (G, H). Escala de las barras: A–B, 800µm; C–F 50µm.

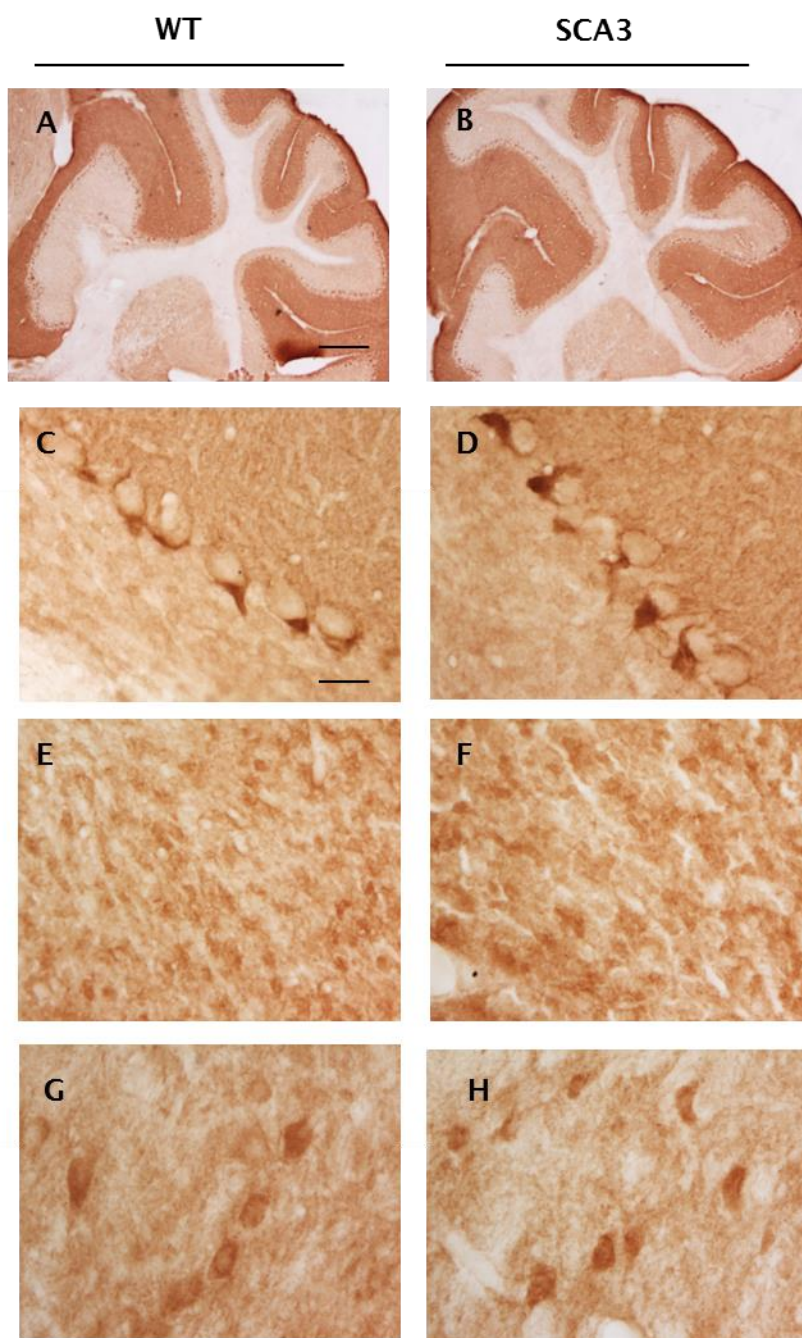


Figura 28. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en el cerebelo a las 32 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el cerebelo de ratones WT (A, C, E, G) y SCA3 (B, D, F, H): corteza cerebelosa (A, B); capa de células de Purkinje (C, D); capa granular (E, F); núcleo dentado (G, H). Escala de las barras: A-B, 800µm; C-F 50µm.

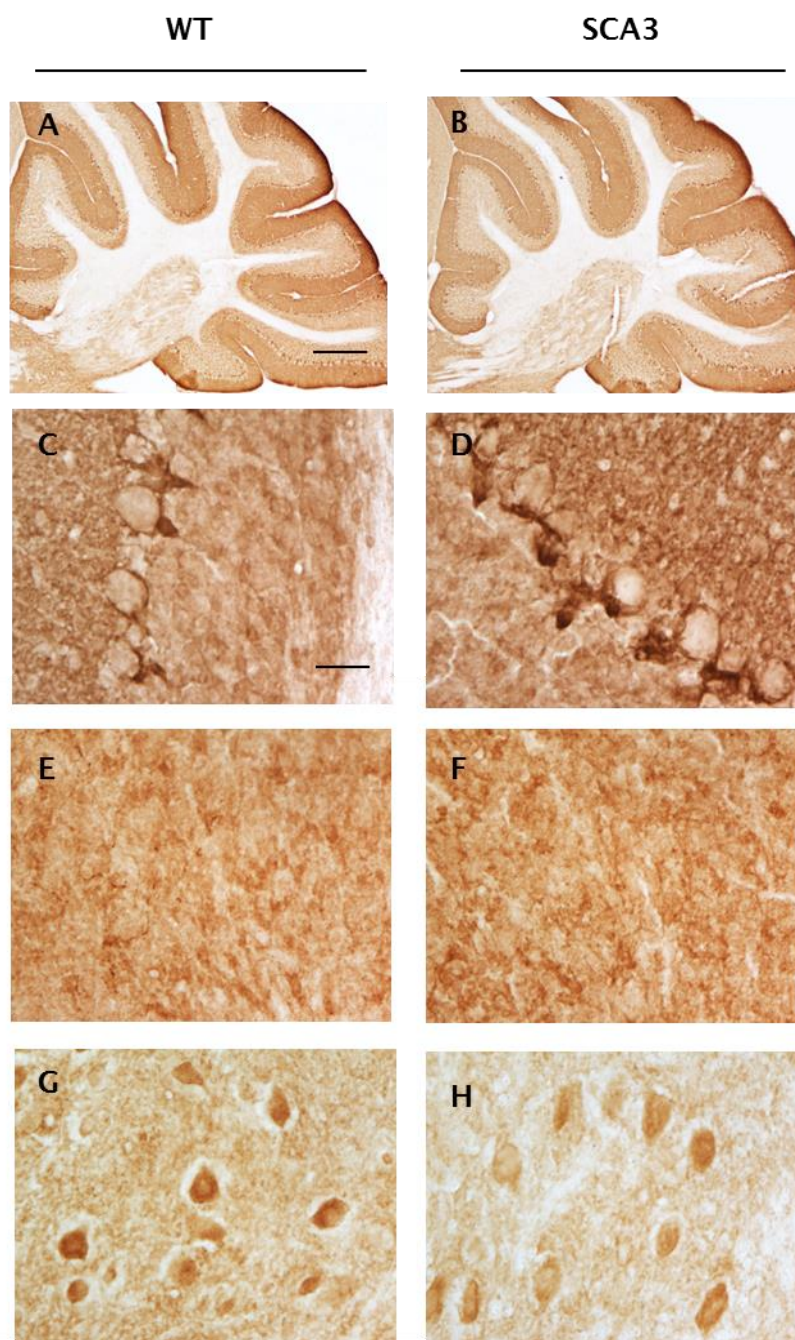


Figura 29. Inmunohistoquímica y *western-blot* para el receptor CB₁ en el cerebelo a las 56 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el cerebelo de ratones WT (A, C, E, G) y SCA3 (B, D, F, H): corteza cerebelosa (A, B); capa de células de Purkinje (C, D); capa granular (E, F); núcleo dentado (G, H). En el panel I se muestra la cuantificación del *western-blot* en esta estructura y una imagen representativa del mismo. Los datos corresponden a la media de seis animales por grupo experimental \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* $p < 0.05$ vs control). Escala de las barras: A-B, 800 μ m; C-F 50 μ m.

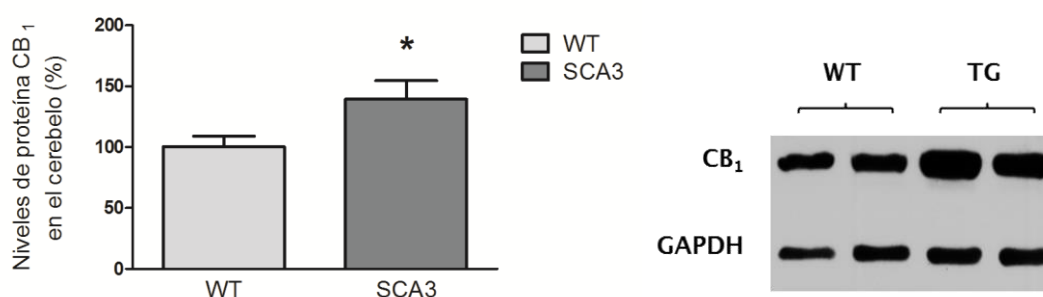


Figura 30. Western-blot para el receptor CB₁ en el cerebelo a las 56 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Se muestra la cuantificación del *western-blot* en esta estructura y una imagen representativa del mismo. Los datos corresponden a la media de seis animales por grupo experimental \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una t de Student (* $p < 0.05$ vs control). Escala de las barras: A-B, 800 μ m; C-F 50 μ m.

El estudio de la inmunotinción para el receptor CB₁ en el núcleo pontino no mostró ninguna diferencia entre ambos grupos experimentales, en consonancia con los resultados obtenidos en el análisis del ARNm para este receptor en esta estructura encefálica. En el núcleo pontino, la inmunotinción para el receptor CB₁ apareció localizada tanto en los somas de las neuronas como en las fibras (Figura 31), de forma similar a lo descrito previamente por otros autores (Cristino et al., 2006; Suárez et al., 2008; Tsou et al., 1998).

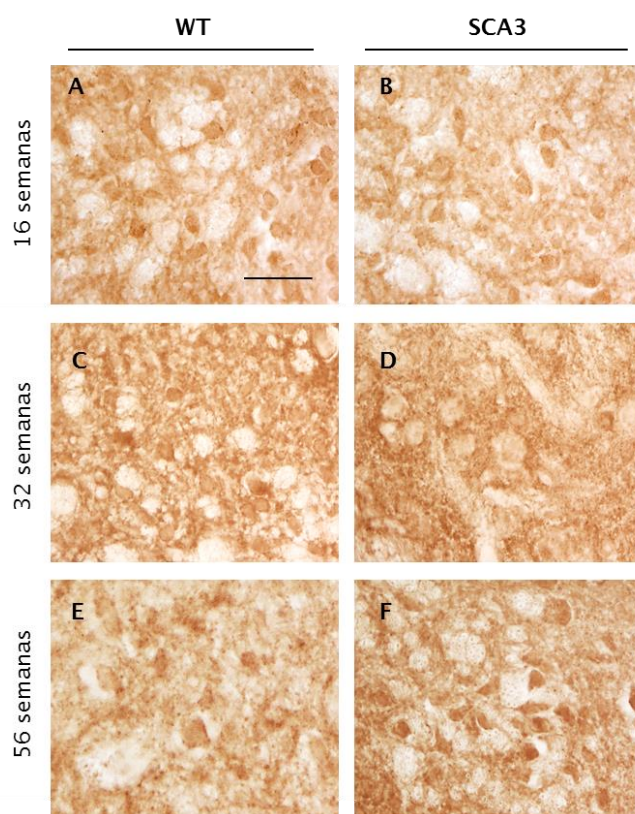


Figura 31. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en el núcleo pontino a las 56 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el núcleo pontino de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F); núcleo dentado (G, H). Escala de la barra 50 μ m.

En relación a la última estructura estudiada, el estriado, los receptores CB₁ se localizan en parte en las fibras y terminales que llegan a esta estructura encefálica como se puede ver en las imágenes obtenidas (Figura 32) y que podrían corresponder a neuronas corticoestriales (Fusco et al., 2004). Se ha podido ver que hay un aparente descenso en la inmunorreactividad en los animales transgénicos a las 56 semanas de edad con respecto a sus controles (Figura 32 E, F, ver detalles en E.I, F.I). Este descenso en la expresión de CB₁ va en paralelo con los datos obtenidos previamente en el análisis del ARNm para este receptor en el estriado de los ratones SCA3, que mostraban un descenso en sus niveles a partir de las 32 semanas de edad. Sin embargo, el ARNm que se mide en el estriado refleja necesariamente el receptor CB₁ presentes en las neuronas de proyección estriatal y no el de las neuronas corticoestriales cuyo ARNm tendría que ser medido en la corteza cerebral. Esto podría indicar que se afectan tanto la población de receptores CB₁ presente en las neuronas que llegan al estriado como en las que proyectan desde el estriado. En parte, esto está en consonancia con los datos obtenidos en el cerebro de pacientes de Huntington y en varios modelos animales de esa enfermedad (Scotter et al., 2010).

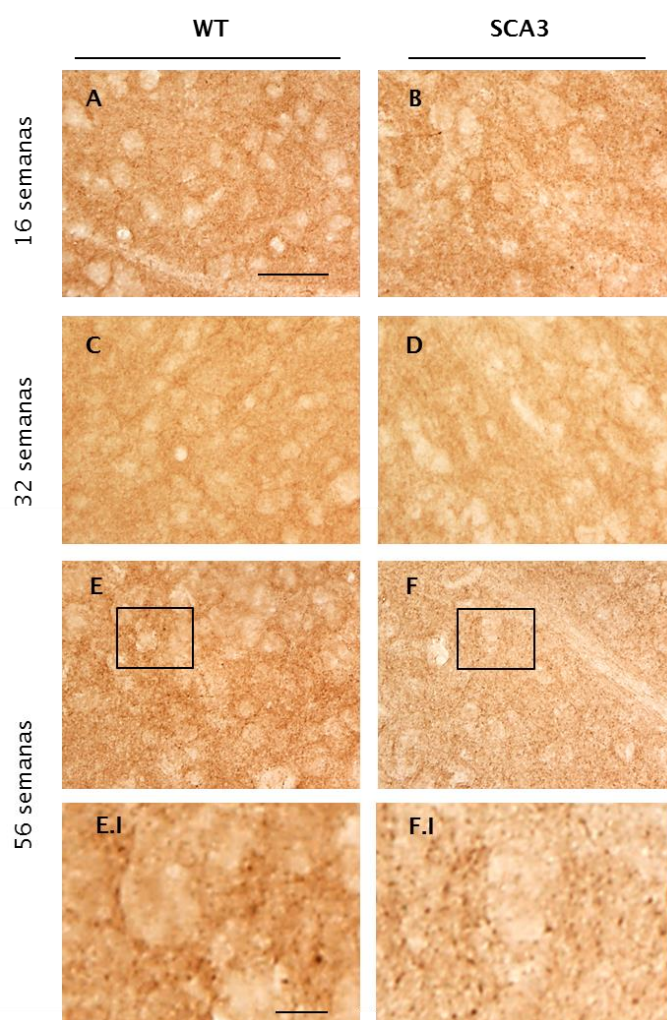


Figura 32. Inmunohistoquímica para el receptor CB₁ en el en el estriado a las 56 semanas de edad de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el estriado de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Nótese el descenso de inmunorreactividad en el estriado de los animales SCA3 en el la fase avanzada de la enfermedad (E.I, F.I). Escala de las barras 50µm; detalles 10µm.

En resumen, nuestros resultados muestran alteraciones en los ratones SCA3 en los receptores cannabinoide, en concreto a nivel del receptor CB₁, en las fases más avanzadas de la enfermedad. Hemos observado un incremento en la inmunotinción del receptor CB₁ en el cerebelo de los ratones SCA3 a las 56 semanas de edad, en contraste con un descenso para este receptor en el estriado desde la fase intermedia de la enfermedad.

2.2.2. Enzimas de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD y DAGL

El análisis de los niveles de ARNm para las enzimas NAPE-PLD y DAGL en el encéfalo de los ratones SCA3 no mostró diferencias respecto a los ratones WT en ninguna de las estructuras cerebrales estudiadas (cerebelo, tronco encefálico y estriado) ni en ninguna de las tres fases de progresión de la enfermedad (Figura 33).

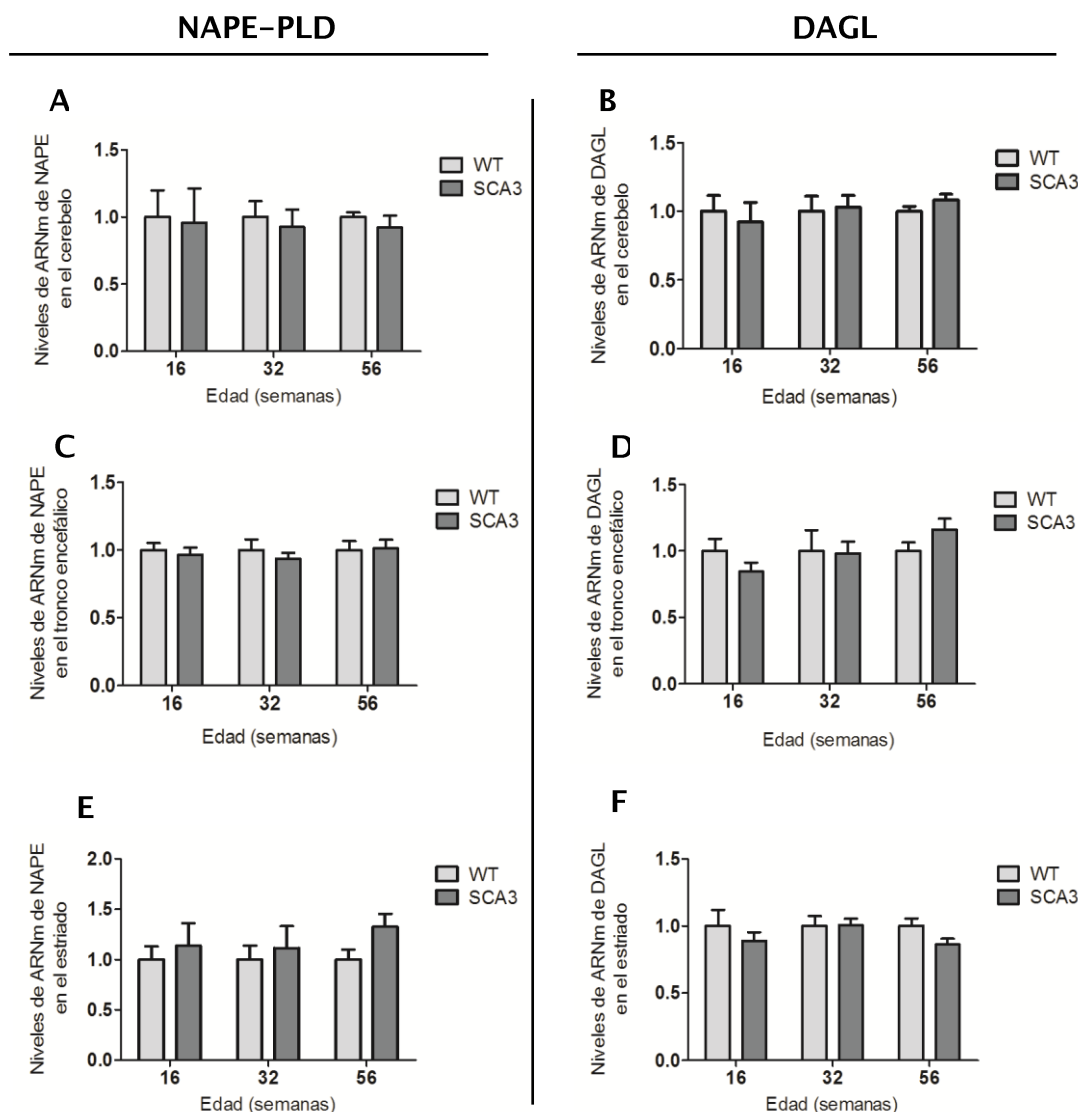


Figura 33. Análisis de la expresión del ARNm de las enzimas de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD y DAGL de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión de las enzimas de síntesis de endocannabinoides NAPE (A, C, E) y DAGL (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control ± SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls.

2.2.3. Enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL

En la Figura 34 se recogen los resultados del análisis de los niveles de ARNm para las enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL en el encéfalo de animales SCA3 y WT.

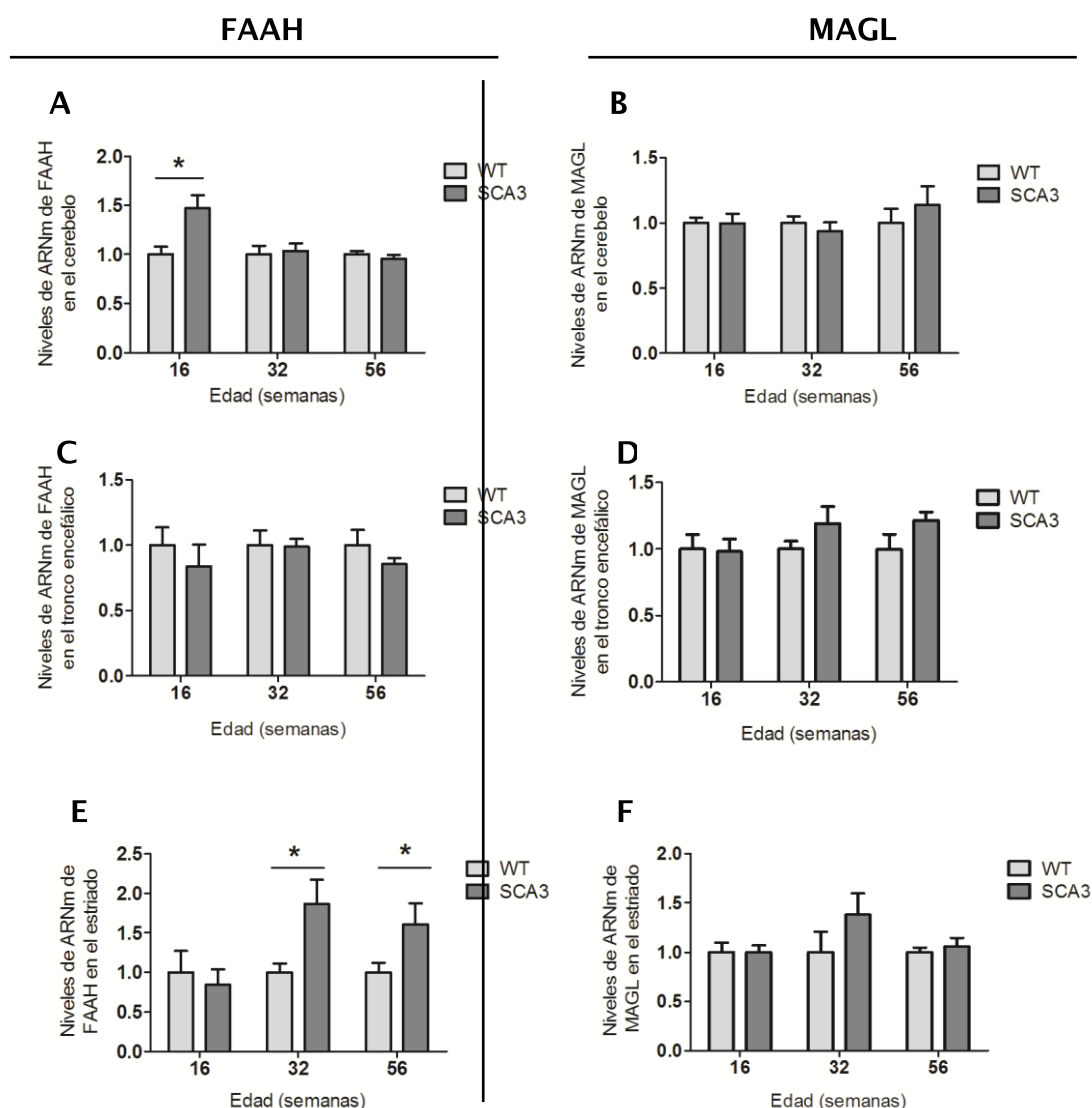


Figura 34. Expresión del ARNm de las enzimas de degradación de cannabinoides FAAH y MAGL de ratones SCA3 y *wildtype*. Análisis de la expresión de las enzimas de síntesis de endocannabinoides FAAH (A, C, E) y MAGL (B, D, F) en los tres estadios de la enfermedad y en las tres estructuras de interés: cerebelo (A, B), tronco encefálico (C, D) y estriado (E, F). Los datos representan la media de seis casos por grupo normalizada respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls. (* $p < 0.05$ vs control).

Nuestros datos mostraron un incremento en la expresión de la enzima de degradación de endocannabinoides FAAH a las 16 semanas de edad en el cerebelo de los animales SCA3. Esta diferencia, sin embargo, desapareció con el tiempo, ya que a las 32 semanas no había cambios significativos (Figura 34 A). En el caso del tronco encefálico no se observaron cambios en la expresión de este enzima (Figura 34 C). Si se observó un aumento significativo en la expresión de la enzima FAAH en el estriado, esta vez desde la etapa intermedia de la enfermedad, diferencias que se mantienen en la fase más avanzada (56 semanas de edad)

(Figura 34 E). Este aumento en los niveles de FAAH en las fases sintomáticas de la enfermedad se ha descrito también en el estriado de pacientes y en modelos animales de la enfermedad de Huntington (Blázquez et al., 2011). Respecto a la principal enzima de degradación del 2-AG, la enzima MAGL, no se observaron diferencias en ninguna de las edades y estructuras estudiadas (Figura 34 B, D, F).

Para profundizar en las posibles alteraciones del patrón de expresión de la proteína FAAH en el cerebro de los animales transgénicos SCA3 también se realizaron experimentos de inmunohistoquímica. Nuestros resultados revelaron una elevada inmunotinción para esta enzima en el cerebelo de los animales control y transgénicos para la SCA3 (Figuras 34-36). En la corteza cerebelosa se observó un cambio en el patrón de distribución de la enzima FAAH en las células de Purkinje de los ratones SCA3 en comparación a los controles (Figuras 34). En las células de Purkinje de los ratones *wildtype* la enzima FAAH presentaba una localización preferentemente perinuclear similar a lo observado en estudios previos (Romero et al., 2002). Sin embargo, en los ratones SCA3 se observó una tinción que además de ser más intensa aparecía distribuida por todo el soma celular (Figura 35). Estos cambios en el patrón de expresión de la enzima FAAH se observaron de forma más clara en la etapa más temprana de la SCA3 (16 semanas) (Figura 35 A, B) aunque se mantienen durante toda la progresión de la enfermedad.

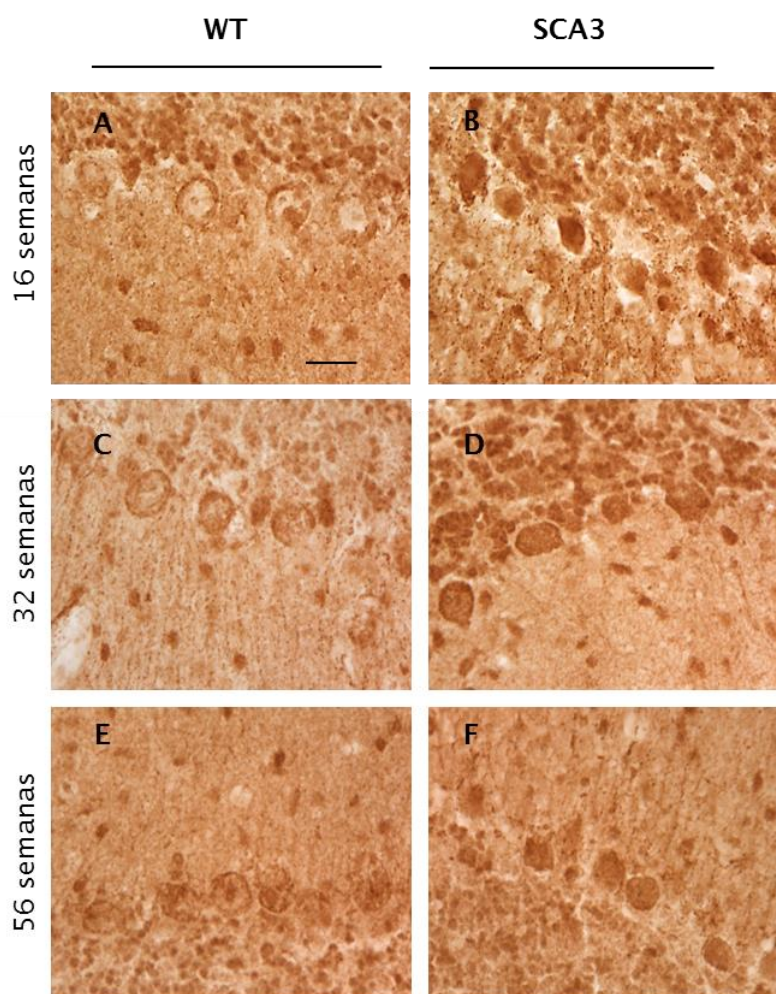


Figura 35. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en la capa de células de Purkinje de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para el receptor CB₁ en el cerebelo de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Escala de las barras 50µm.

En la sustancia blanca de las folias cerebelosas se pudo observar también un claro aumento de inmunorreactividad para la enzima FAAH en los animales transgénicos en comparación con los controles, aumento que, al igual que ocurría en las células de Purkinje, pareció ser más evidente en las etapas iniciales de la enfermedad aunque se mantuvo durante la progresión del fenotipo patológico (Figura 36). Estos datos son similares a los que observamos previamente en las muestras *post mortem* de pacientes de SCA. Por último, las neuronas del núcleo dentado también mostraron señal para FAAH, aunque no se observaron diferencias claras entre ambos grupos experimentales (Figura 37).

Para cuantificar la relevancia de estas observaciones se analizaron los niveles de proteína mediante *western-blot* en el cerebelo. Los resultados obtenidos muestran una tendencia al alza en los niveles de la proteína FAAH en las fases temprana e intermedia de la enfermedad, diferencias que desaparecen en la fase más avanzada (Figura 38).

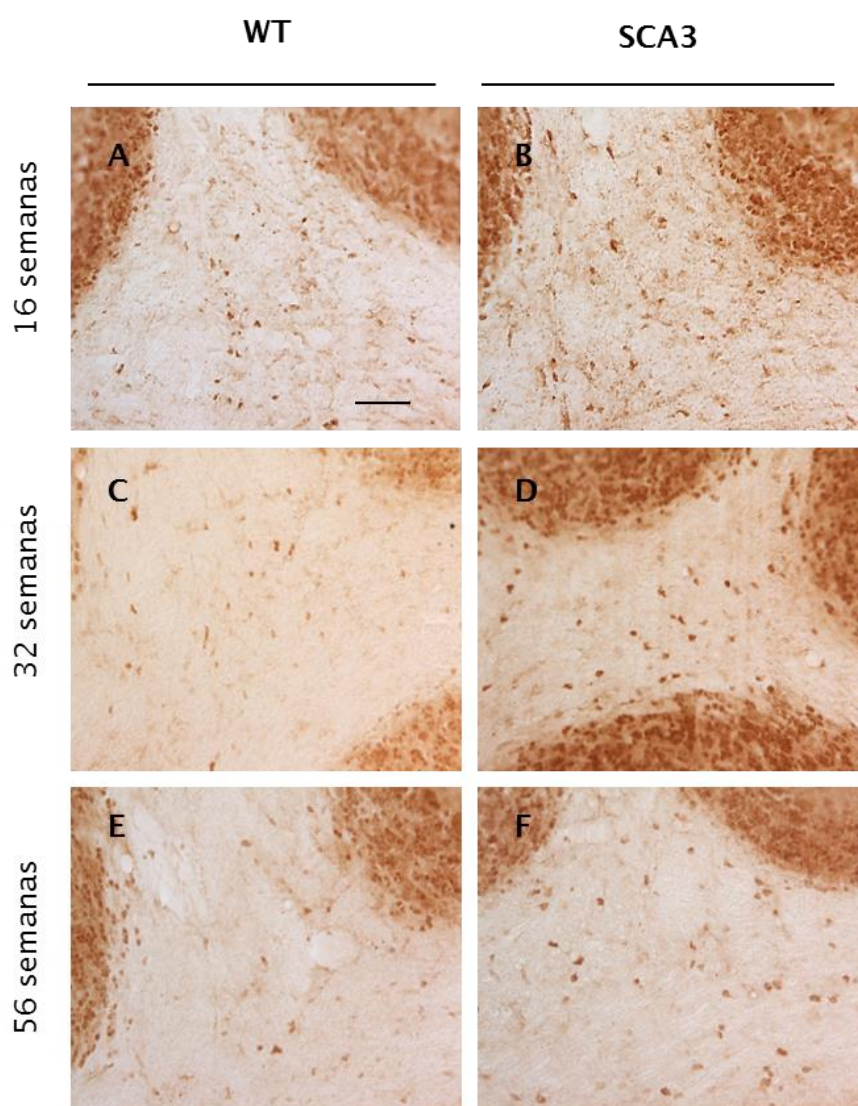


Figura 36. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en la sustancia blanca de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para la enzima FAAH en la sustancia blanca subcortical del cerebelo de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Escala de las barras 50µm.

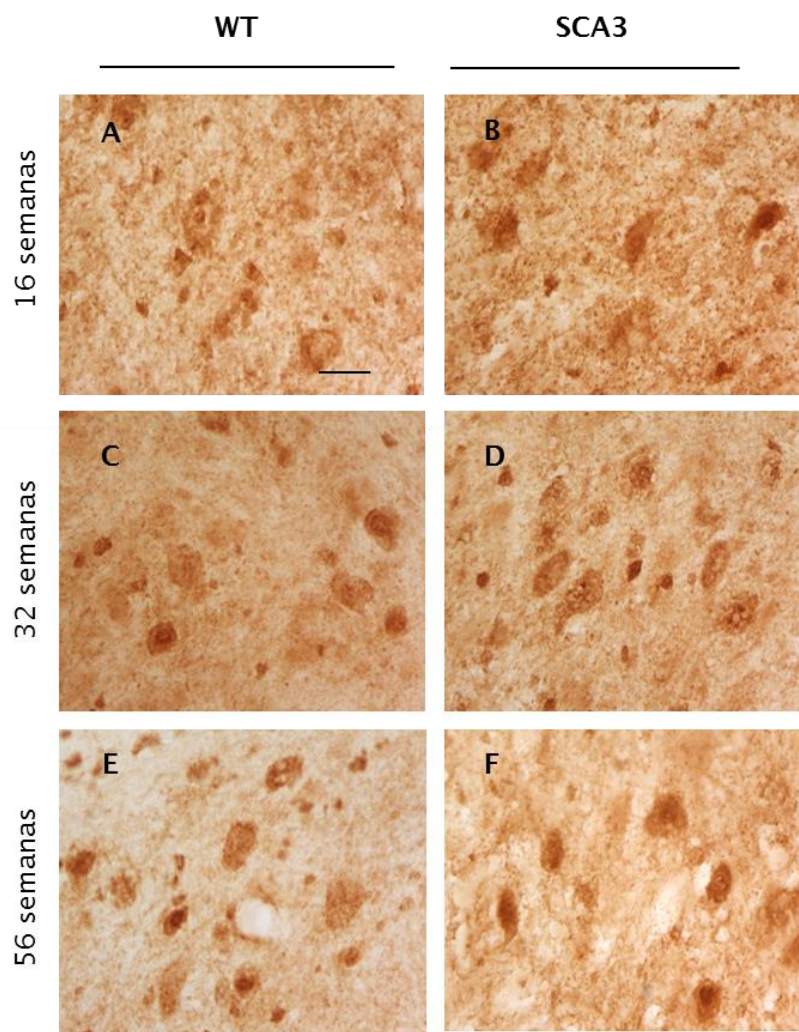


Figura 37. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en el núcleo dentado de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para la enzima FAAH en el núcleo dentado del cerebelo de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Escala de las barras 50µm.

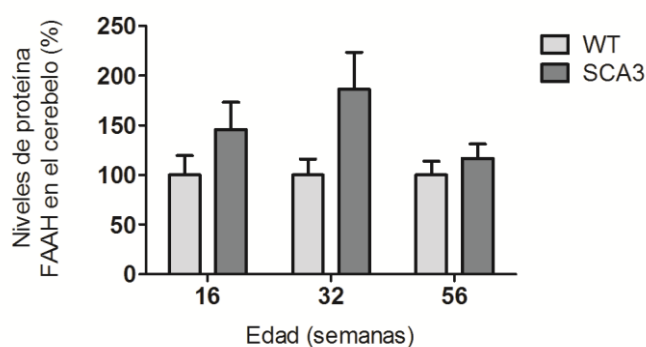


Figura 38. *Western-blot* para la enzima FAAH en el cerebelo de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos corresponden a la media de seis animales por grupo experimental y se expresan como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls.

Respecto al tronco encefálico, los experimentos de inmunohistoquímica para la enzima FAAH mostraron un aumento de inmunorreactividad en esta estructura encefálica en los ratones SCA3 en comparación a los ratones *wildtype*. Este aumento en la enzima FAAH fue más evidente en las fases temprana e intermedia de la enfermedad (Figura 39). Este incremento de expresión de FAAH fue particularmente evidente en las fibras y en el cuerpo celular de las neuronas de varios núcleos del tronco encefálico como por ejemplo en el núcleo pontino (Figura 40).

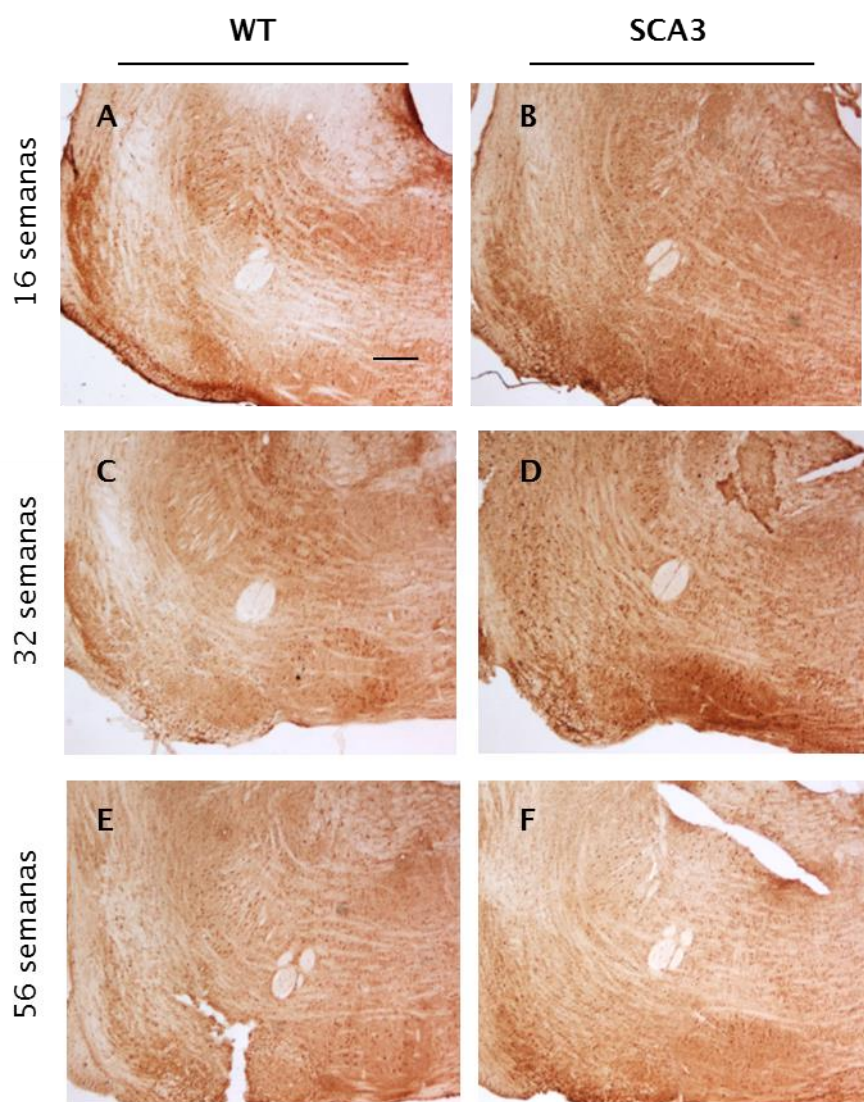


Figura 39. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en el tronco encefálico de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para la enzima FAAH en el tronco encefálico de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Escala de las barras 50µm.

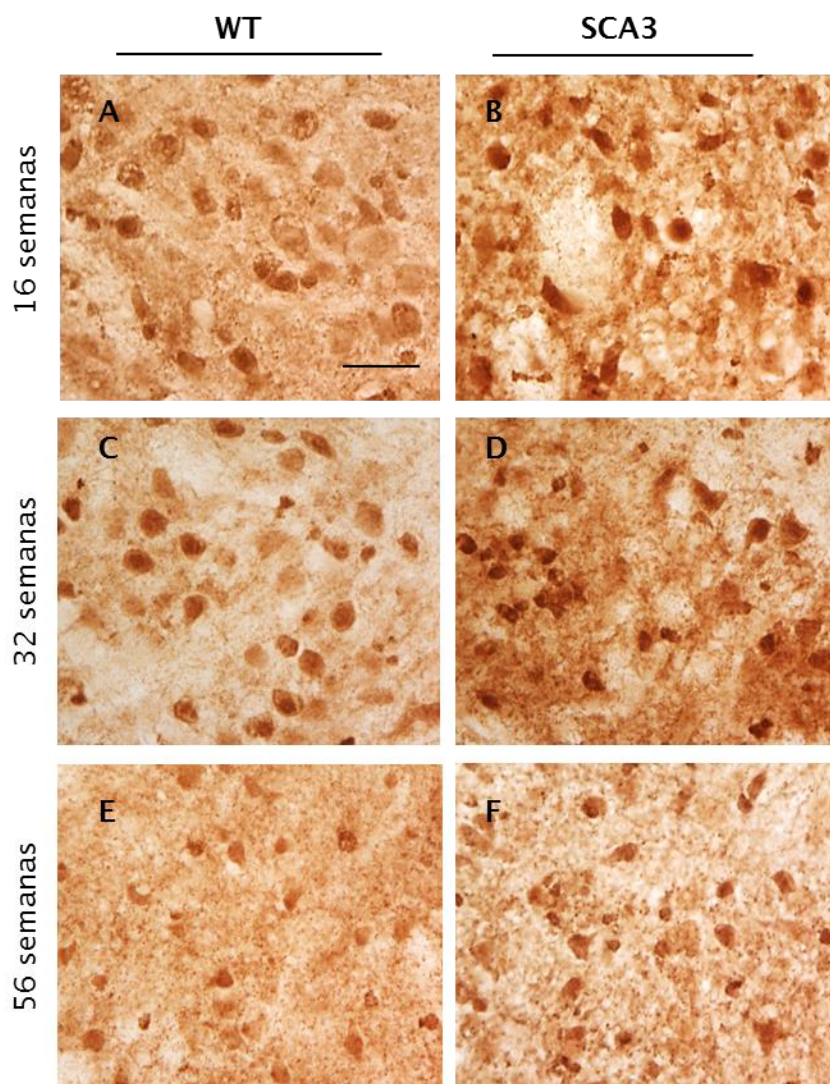


Figura 40. Inmunohistoquímica para la enzima FAAH en el núcleo pontino de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad para la enzima FAAH en el núcleo pontino de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). Escala de las barras 50µm.

El análisis de los niveles de proteína confirmó este incremento de FAAH en el tronco encefálico de los animales SCA3 con respecto a sus controles, un incremento que empieza a apreciarse a las 16 semanas de edad ($p=0.1783$) y que se hace más evidente en la fase intermedia de la enfermedad (32 semanas). Sin embargo, las diferencias observadas en la expresión de esta enzima en el tronco encefálico desaparecen a las 56 semanas de edad (Figura 41).

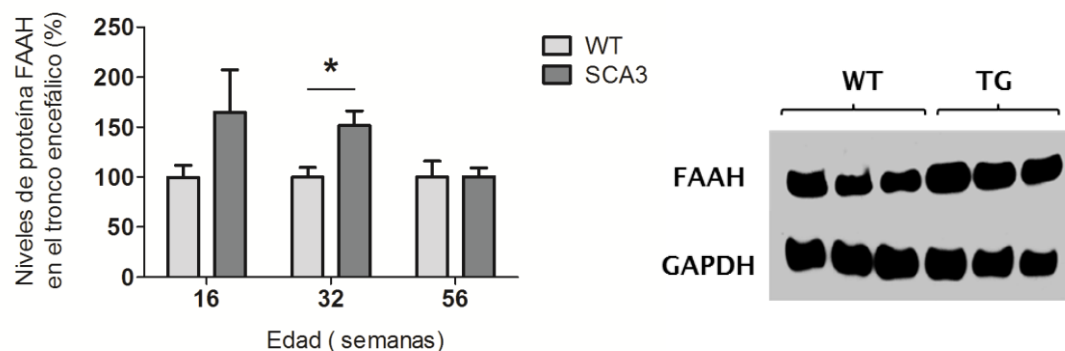


Figura 41. Western-blot para la enzima FAAH en el tronco encefálico de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos corresponden a la media de seis animales por grupo experimental expresados como porcentaje normalizado respecto a la media del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls. (* $p < 0.05$ vs control).

Para completar el estudio de la expresión de FAAH en los ratones transgénicos SCA3, se analizó también el estriado de estos animales. Nuestros datos de inmunohistoquímica no mostraron ninguna diferencia clara en esta estructura encefálica a las edades temprana e intermedia de la enfermedad (16 y 32 semanas respectivamente) (Figura 42 A-H). Sin embargo, en la fase avanzada (56 semanas), a pesar de haber un menor número de neuronas según los datos que se han ido presentado anteriormente, las células supervivientes presentaban una mayor inmunorreactividad para la enzima FAAH (Figura 42 I-L). *A priori* este aumento en los niveles de FAAH en la fase avanzada de la enfermedad se correlaciona por un lado con los datos previamente mostrados en los que observamos un aumento del ARNm para esta enzima. Además, como ya se ha dicho antes, el aumento de FAAH está de acuerdo con los datos obtenidos en el análisis del estriado de pacientes y modelos animales de la enfermedad de Huntington (Blázquez et al., 2011). Sin embargo, es importante destacar que dada la significativa pérdida de células que se da en la enfermedad la enzima FAAH en este estadio de la enfermedad resultó ser menor en los ratones SCA3 en comparación con los animales sanos, como se pudo comprobar mediante el análisis de los niveles de la proteína en el estriado mediante *western-blot* (Figura 42 M).

Como resumen a esta parte, se puede decir que nuestros resultados muestran alteraciones a nivel de la proteína FAAH en el cerebro de ratones SCA3 en comparación con los controles. Estas alteraciones consisten en un incremento de expresión en la fase temprana e intermedia de la enfermedad en el caso del cerebelo y el tronco encefálico, y en la fase avanzada en el caso del estriado.

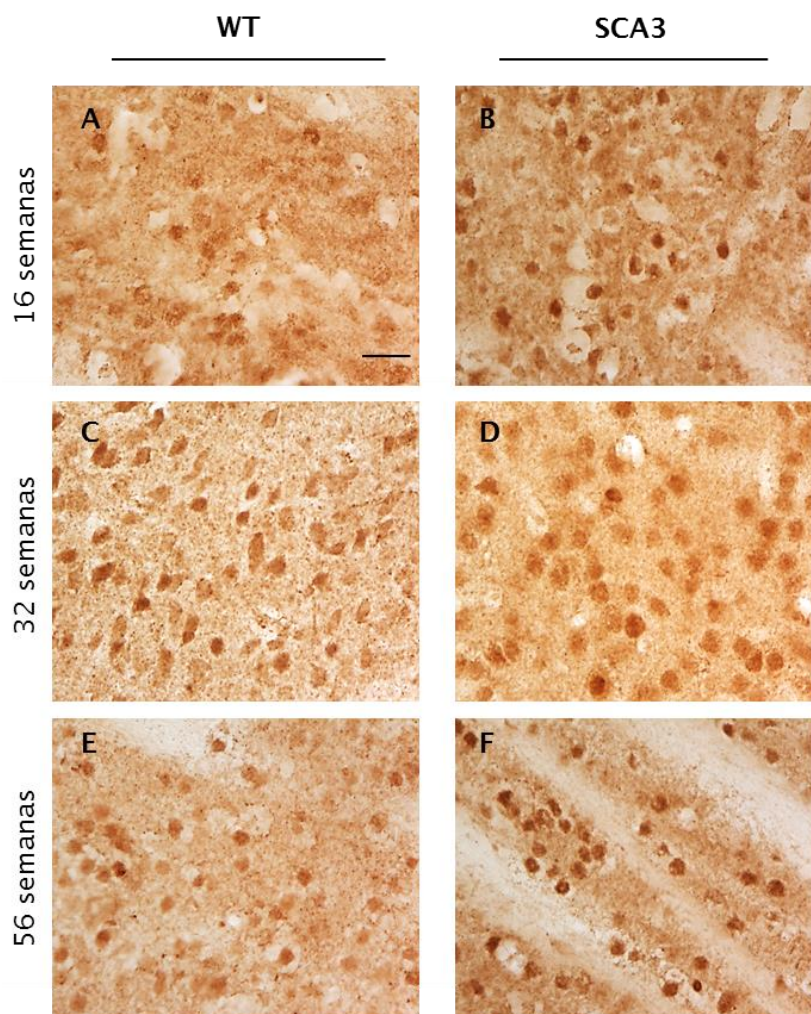


Figura 42. Inmunohistoquímica y *western blot* para la enzima FAAH en el estriado de ratones SCA3 y *wildtype*. Inmunorreactividad de la enzima FAAH en el estriado de ratones WT (A, C, E) y SCA3 (B, D, F): 16 semanas de edad (A, B); 32 semanas (C, D); 56 semanas de edad (E, F). En el panel G se muestra la cuantificación del *western- blot* en el tronco encefálico. Los datos corresponden a la media de seis animales por grupo experimental y se presentan en porcentaje normalizado respecto al valor medio del grupo control \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls. Escala de las barras 200 μ m, detalles 50 μ m.

2.2.4. Endocannabinoides y lípidos derivados

Una vez demostrada la existencia de cambios en la expresión del receptor CB₁ y de la enzima FAAH en el cerebro de los animales transgénicos de SCA3, se estudiaron los cambios que se dan a nivel de los propios endocannabinoides. Para ello, se analizaron las concentraciones de AEA y dos *N*-aciletanolaminas relacionadas estructuralmente como son la PEA y la OEA. Se midieron también los niveles de 2-AG y su análogo estructural el 2-OG. Todas las medidas se hicieron en las tres regiones encefálicas utilizadas anteriormente y provenientes tanto de animales SCA3 como *wildtype*.

2.2.4.1. AEA y *N*-aciletanolaminas

El análisis de los niveles de AEA y de las *N*-aciletanolaminas mediante LC-MS en el cerebelo de los ratones transgénicos no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativas respecto a los animales *wildtype* en ninguna de las tres edades analizadas (Figura 43).

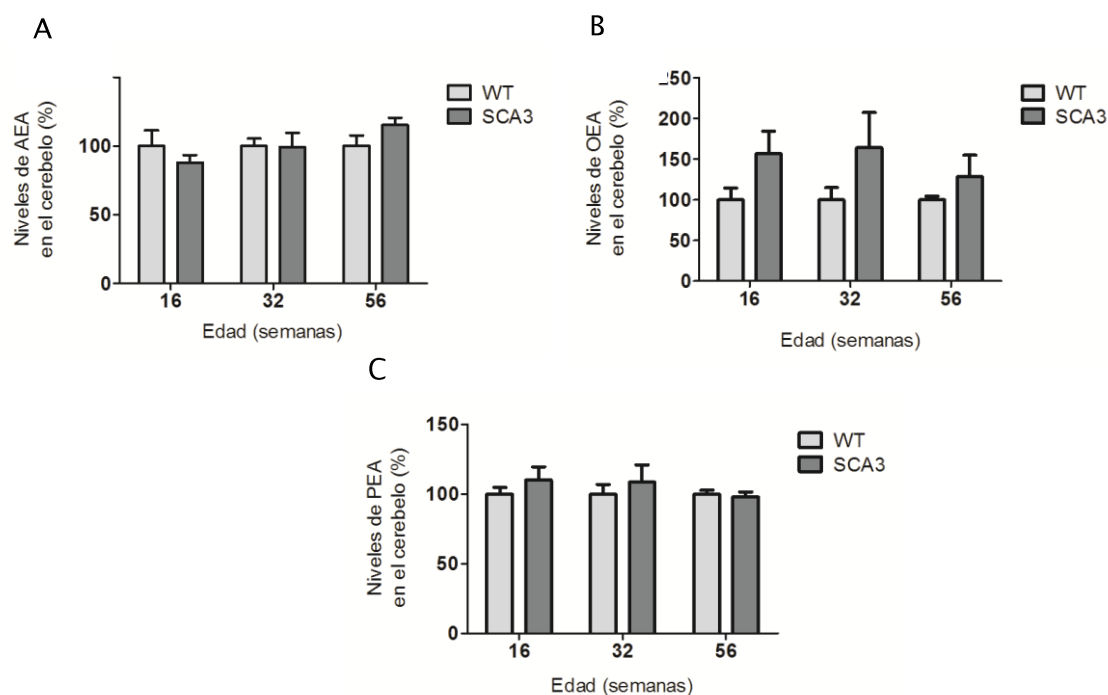


Figura 43. Análisis de los niveles de AEA y *N*-aciletanolaminas en el cerebelo de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos representan la media de cinco casos por grupo experimental normalizados respecto al valor medio del grupo control \pm SEM: AEA (A), PEA (B) y OEA (C). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls.

El análisis de los mismos parámetros en el tronco cerebral sí que puso cambios significativos en los niveles de algunas de la *N*-aciletanolaminas (Figura 44). En concreto, observamos un descenso marcado en la AEA en la fase intermedia de la enfermedad (32 semanas de edad) en los ratones SCA3, con respecto a los niveles de los animales controles. Sin embargo, este descenso desapareció con el tiempo, ya que a las 56 semanas de edad no se observaba ninguna diferencia entre los animales SCA3 y los WT (Figura 44 A). Algo parecido pasó para la OEA, ya que se observaba una disminución significativa a las 16 semanas de edad, que se mantenía a las 32 semanas, pero que desaparecería en la fase más avanzada de la enfermedad (56 semanas de edad) (Figura 44 C), mientras que la PEA se mantuvo siempre en niveles similares para ambos grupos experimentales (Figura 44 B). Estos datos estarían en consonancia con el aumento de expresión observado para la enzima FAAH, principal enzima de degradación de AEA y *N*-aciletanolaminas, en el tronco encefálico de los ratones SCA3, tal como ha sido descrito anteriormente. En relación a la otra región cerebral estudiada, el estriado, el análisis de los niveles de las NAEs no mostró ninguna diferencia significativa entre ambos grupos experimentales (Figura 45).

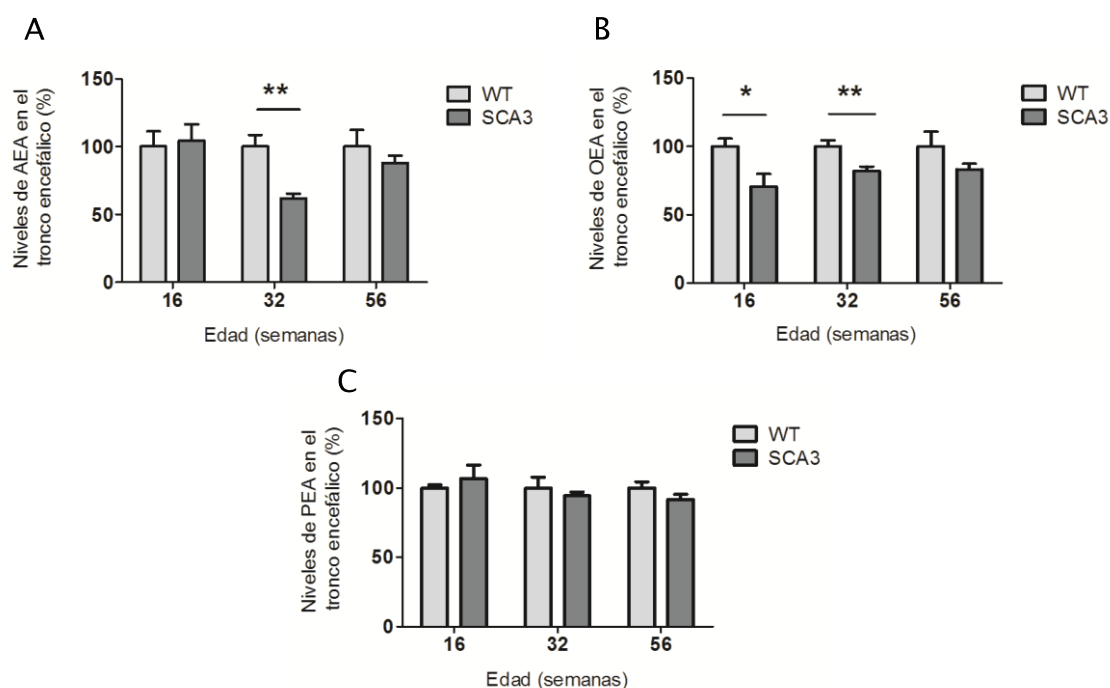


Figura 44. Análisis de los niveles de AEA y N-aciletanolaminas relacionadas en el tronco encefálico de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos representan la media de cinco casos por grupo experimental normalizados respecto al valor medio del grupo control \pm SEM: AEA (A), PEA (B) y OEA (C). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control).

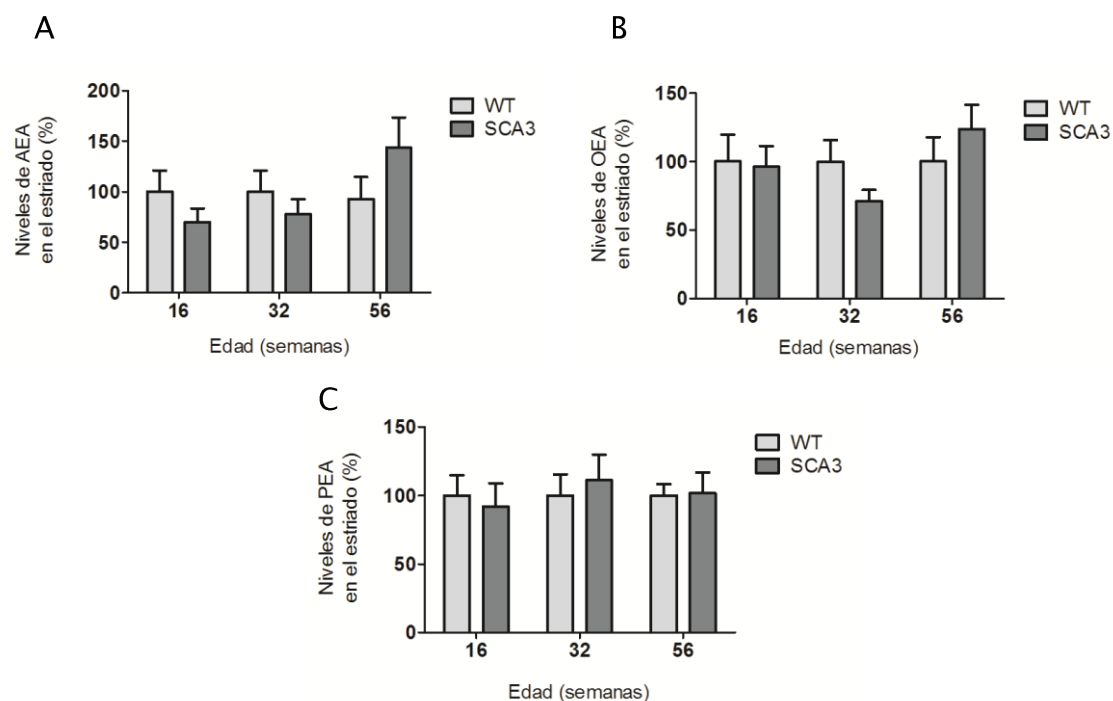


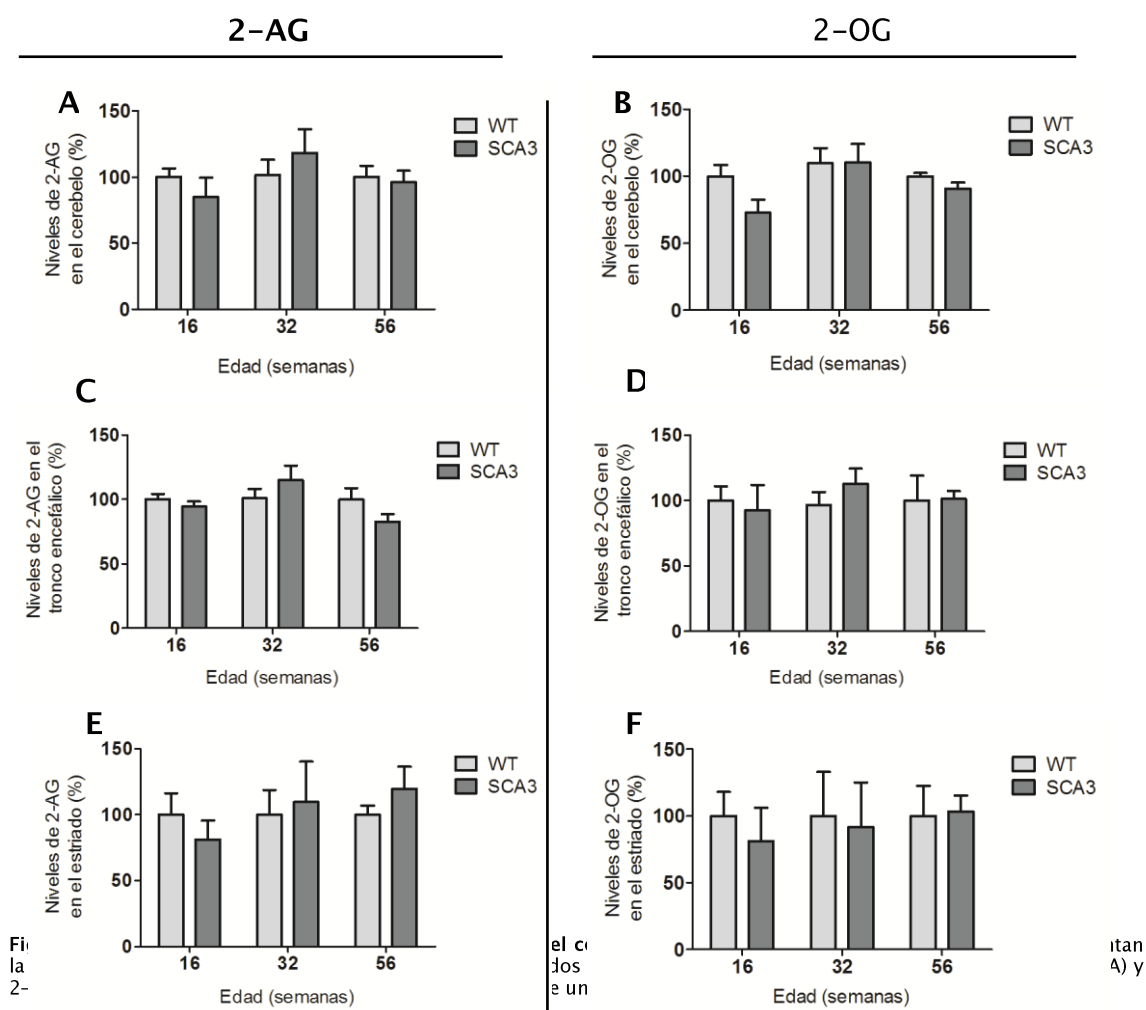
Figura 45. Análisis de los niveles de AEA y otras N-aciletanolaminas en el estriado de ratones SCA3 y *wildtype*. Los datos representan la media de cinco casos por grupo experimental normalizados respecto al valor medio del grupo control \pm SEM: AEA (A), OEA (B) y PEA (C). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls.

Es interesante indicar que esta es la primera vez que se miden los niveles de *N*-aciletanolaminas en un modelo experimental de una SCA, y al igual que ocurría para el receptor CB₁ y para la enzima FAAH, los datos obtenidos en cuanto a los niveles de estos derivados lipídicos parecen similares a los descritos previamente en varios modelos animales de la enfermedad de Huntington (Bisogno et al., 2008; Dowie et al., 2009; Lastres-Becker et al., 2001), por lo que podrían interpretarse como una respuesta común en ambos tipos de enfermedades que comparten mecanismos patogénicos comunes, aunque este paralelismo en los niveles de endocannabinoides ocurre en relación a las principales estructuras afectadas en cada enfermedad, que serían diferentes en cada una, pero no ocurre cuando se comparan las mismas estructuras. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Huntington, estos cambios ocurren en el estriado, una estructura que también hemos analizado en los ratones SCA3, pero curiosamente no se observaron cambios en los niveles de AEA y las otras dos *N*-aciletanolaminas en estos animales SCA3 en comparación con sus controles (Figura 45).

2.2.4.2. 2-AG y 2-OG

En cuanto al análisis de los monoacilglicerol 2-AG y 2-OG, tal y como se muestra en la Figura 46, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estos ligandos entre ambos grupos experimentales en ninguna de las edades y estructuras analizadas.

Por tanto, como conclusión de esta parte del estudio en la que se han medido los cambios en elementos del sistema endocannabinoide en los ratones SCA3, podemos decir que los resultados obtenidos muestran cambios en algunos elementos del SCE en el encéfalo de los animales enfermos de SCA3. De forma particular estos cambios se dan en el receptor CB₁ y en la enzima FAAH, elementos cuya distribución en el encéfalo es complementaria (Egertová et al., 1998) y está asociada a la presencia de AEA (Bisogno et al., 1999; Felder et al., 1996), la cual también hemos visto se ve afectada en los animales transgénicos SCA3. Es importante señalar que estas alteraciones tienen una especificidad regional, ya que se producen de forma diferente en el cerebelo, tronco cerebral y estriado.



2.3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE HETERÓMEROS DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES

Dado que los principales receptores cannabinoide son receptores GPCRs, CB_1 y CB_2 , y que se ha visto de forma relativamente reciente que se pueden dar fenómenos de heteromerización entre GPCRs de diferentes sistemas de Neuroprotección y neuromodulación en el SNC, lo que facilita interacciones a nivel de señalización y respuesta celular, así como a nivel farmacológico (Ferré et al., 2009), quisimos también estudiar las interacciones de ambos receptores entre sí, y, en el caso del CB_1 con otros GPCRs. En concreto, se estudiaron los heterómeros del receptor CB_1 con el receptor de adenosina A_{2A} y con el receptor cannabinoide CB_2 . Ambos tipos de heterómeros se ha visto que son funcionales tanto en células transfectadas como en diferentes áreas del SNC (Callén et al., 2012; Carriba et al., 2007). Con este bloque de experimentos nos propusimos analizar las diferencias en la influencia que se produce sobre la actividad cannabinoide, por la formación de estos complejos heterodiméricos CB_1 - A_{2A} y CB_1 - CB_2 comparando los animales transgénicos SCA3 y *wildtype*.

2.3.1. Análisis del heterómero CB₁-A_{2A} y CB₁-CB₂

A través de aproximaciones *in vitro* e *in vivo* se ha visto la existencia de heterómeros funcionales CB₁-A_{2A} en el estriado y globo pálido de rata y en células transfectadas (Carriba et al., 2007). En nuestro caso, pudimos confirmar la presencia de este heterómero en el estriado (

Figura 49) de los ratones *wildtype* a todas las edades estudiadas (16, 32 y 56 semanas de edad), pero nuestros datos también revelaron la presencia del heterómero CB₁-A_{2A} en la corteza del cerebelo (tanto capa granular como molecular) (Figura 47), así como en el núcleo pontino del tronco encefálico (Figura 48) de los ratones control.

Lo interesante fue la identificación de estos heterómeros en el modelo de SCA3. Nuestros resultados revelaron la presencia de estos complejos heterodiméricos en las fases temprana e intermedia de la enfermedad. Sin embargo, la formación de estos heterómeros se redujo drásticamente en el encéfalo de los animales SCA3 en la fase avanzada de la enfermedad, una pérdida que se observó en todas las estructuras encefálicas analizadas (especialmente en el cerebelo y en el núcleo pontino) (Figura 47-

Figura 49).

Esta pérdida de los heterómeros no refleja simplemente la pérdida neuronal que se produce en la SCA3 porque ya hemos visto que es relativamente pequeña. Por tanto, se trata de pérdida real de la capacidad de heteromerización. Es importante señalar que aunque son todavía datos preliminares el análisis de las muestras del cerebelo *post mortem* de pacientes de pacientes con SCAs parece mostrar la misma pérdida del heterómero CB₁-A₂ (datos no mostrados). Además, estudios recientes realizados en modelos animales y en muestras *post mortem* de pacientes afectados por la enfermedad de Huntington han mostrado el mismo tipo de descenso en la formación del complejo CB₁-A_{2A} (datos no publicados). Esto podría sugerir un mecanismo común de respuesta ante este fenómeno entre ambas enfermedades.

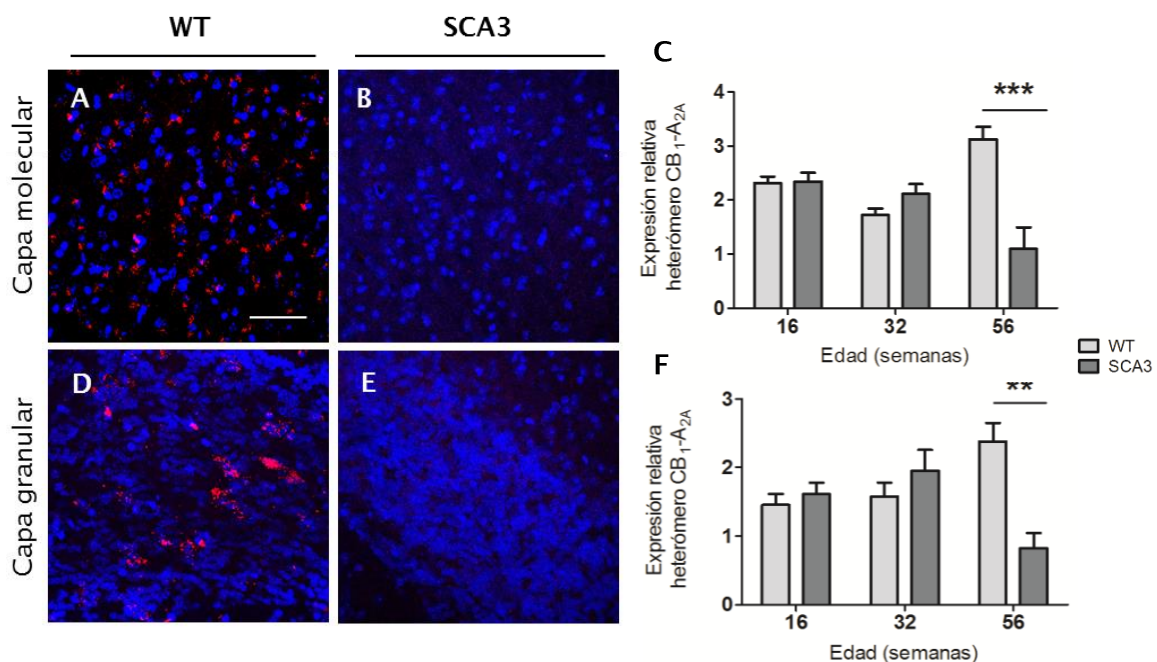


Figura 47. Heterómeros CB₁-A_{2A} en el cerebelo de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-A_{2A} en el cerebelo de ratones WT (A, C) y SCA3 (B, E) a las 56 semanas de edad: capa molecular (A, B) y capa granular (D, E). Análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas en los experimentos de PLA (E, F). Los datos

corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control). Escala de las barras 50 μ m.

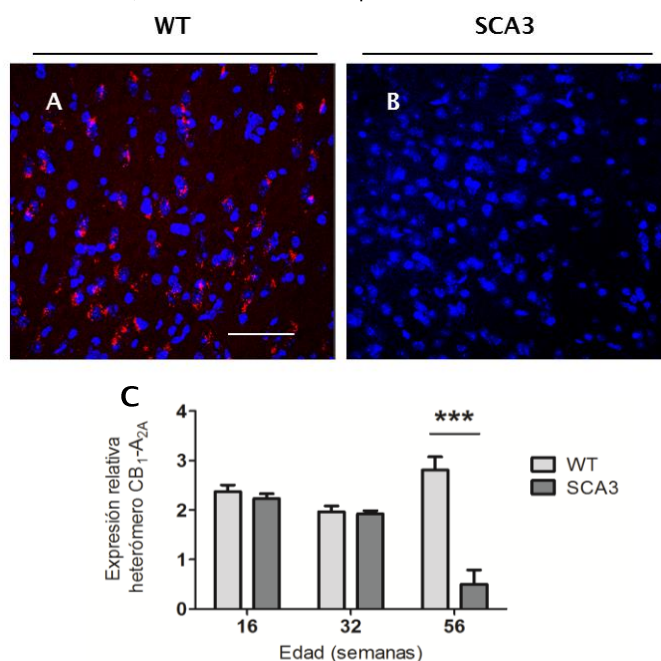


Figura 48. Heterómeros CB₁-A_{2A} en el núcleo pontino del tronco encefálico de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-A_{2A} en el núcleo pontino de ratones WT (A) y SCA3 (B) a las 56 semanas de edad. Análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas en los experimentos de PLA (C). Los datos corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control). Escala de las barras 50 μ m.

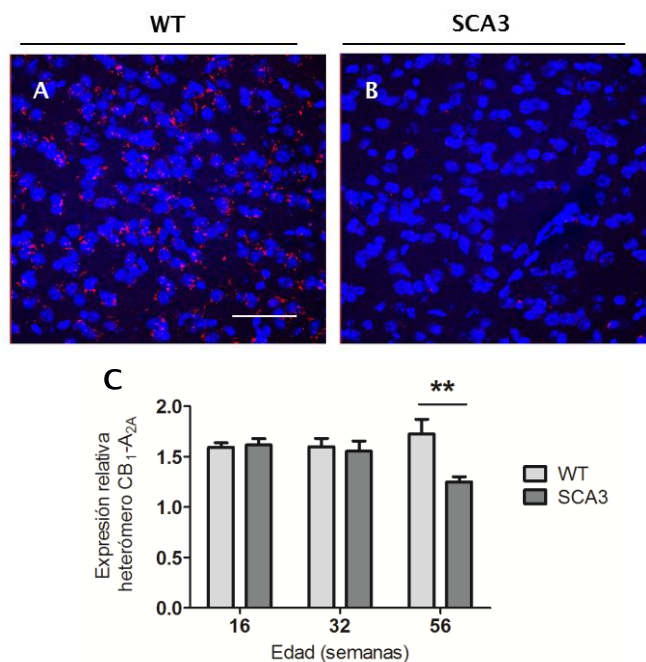


Figura 49. Heterómeros CB₁-A_{2A} en el estriado de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-A_{2A} en el estriado de ratones WT (A) y SCA3 (B) a las 56 semanas de edad. Análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas en los experimentos de PLA (C). Los datos corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se

representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (** $p < 0.01$ vs control). Escala de las barras 50 μm .

2.3.2. Análisis del heterómero CB₁-CB₂

La heteromerización no siempre implica receptores de diferentes sistema de neurotransmisión o neuromodulación sino que también puede producirse entre receptores distintos del mismo sistema y esto se ha visto que ocurre entre los receptores CB₁ y CB₂ en neuronas en cultivo y también en diferentes estructuras del cerebro de rata en cerebro de rata (núcleo acumbens y globo pálido) y también en la glándula pineal (Callén et al., 2012). Nuestros resultados demostraron también la presencia de heterodímeros CB₁-CB₂ en el encéfalo de los ratones sanos, en particular se observó expresión en la corteza cerebelosa, en la capa granular y en la capa molecular, además de en el núcleo pontino del tronco encefálico y en el estriado y se pudieron cuantificar las diferencias en la formación de este heterómero en el encéfalo de los animales *wildtype* en todas las edades estudiadas en comparación con los ratones SCA3 (Figuras 49-51). Sin embargo, al igual que ocurría en el caso del complejo CB₁-A_{2A}, se observó una drástica caída en la expresión del heterómero CB₁-CB₂ en el cerebro de los animales transgénicos SCA3. Vimos que, al igual que ocurría en el caso del complejo CB₁-A_{2A}, había una drástica caída en la expresión del heterómero CB₁-CB₂ en el encéfalo de los animales transgénicos SCA3 respecto a los controles. En este caso, la pérdida de heterómeros CB₁-CB₂ se observaba ya en la fase intermedia de la enfermedad en todas las estructuras analizadas: cerebelo (capa granular y capa molecular) (Figura 50), núcleo pontino (Figura 51) y estriado (Figura 52).

De la misma forma que en caso de los heterómeros CB₁-A_{2A}, la reducción en la formación de los heterómeros CB₁-CB₂ se observó también en el cerebelo *post mortem* de un paciente de SCA3 y otro de SCA7 en estudios todavía preliminares (datos no mostrados), y se ha visto también en la corteza cerebral y en el estriado de modelos animales de la enfermedad de Huntington (datos no publicados). De esta manera, nuestros datos parecen estar, una vez más, en consonancia con lo descrito para esta otra poliglutaminopatía, lo que podría sugerir un mecanismo común para la pérdida de estos heterómeros.

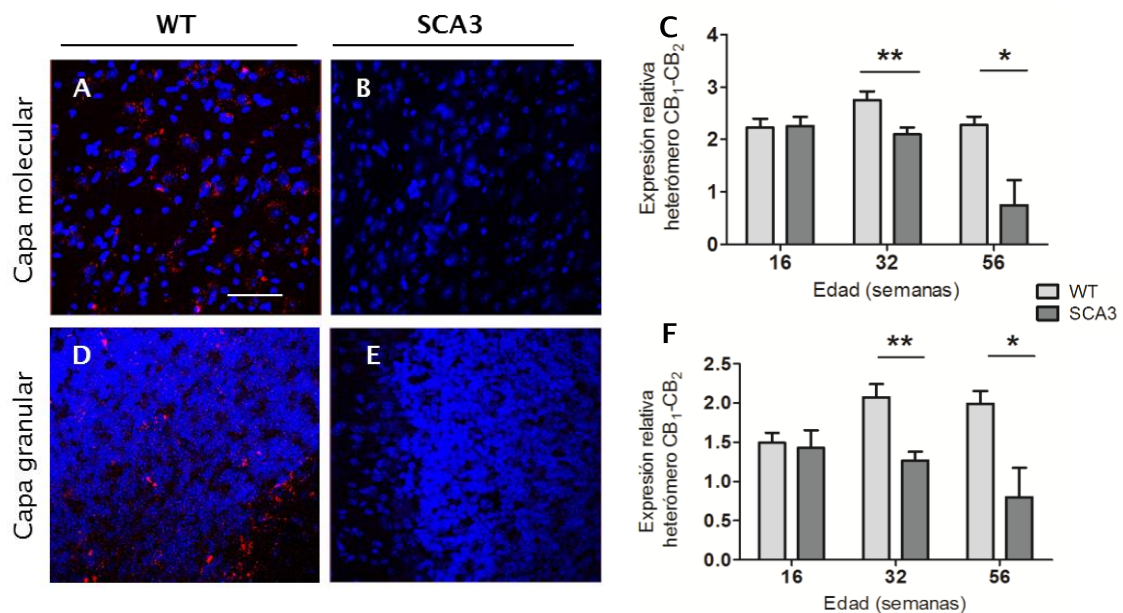


Figura 50. Heterómeros CB₁-CB₂ en el cerebelo de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-CB₂ en el cerebelo de ratones WT (A, C) y SCA3 (B, E) a las 56 semanas de edad: capa molecular (A, B) y capa granular (B, E). Los datos corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control). Escala de las barras 50 μ m.

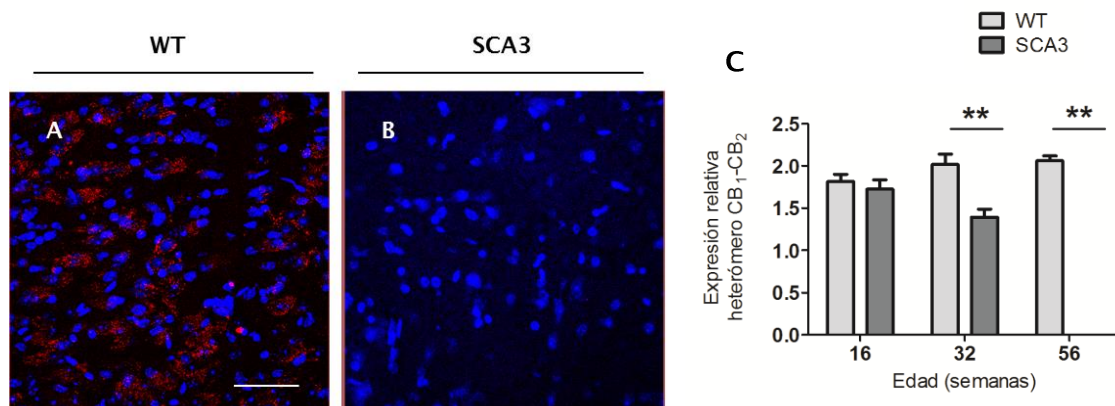


Figura 51. Heterómeros CB₁-CB₂ en el núcleo pontino del tronco encefálico de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-CB₂ en el núcleo pontino de ratones WT (A) y SCA3 (B) a las 56 semanas de edad. Análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas en los experimentos de PLA (C). Los datos corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Nótese la completa desaparición de los heterómeros CB₁-CB₂ en el estriado de los ratones transgénicos SCA3 a las 56 semanas de edad. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (** $p < 0.01$ vs control). Escala de las barras 50 μ m.

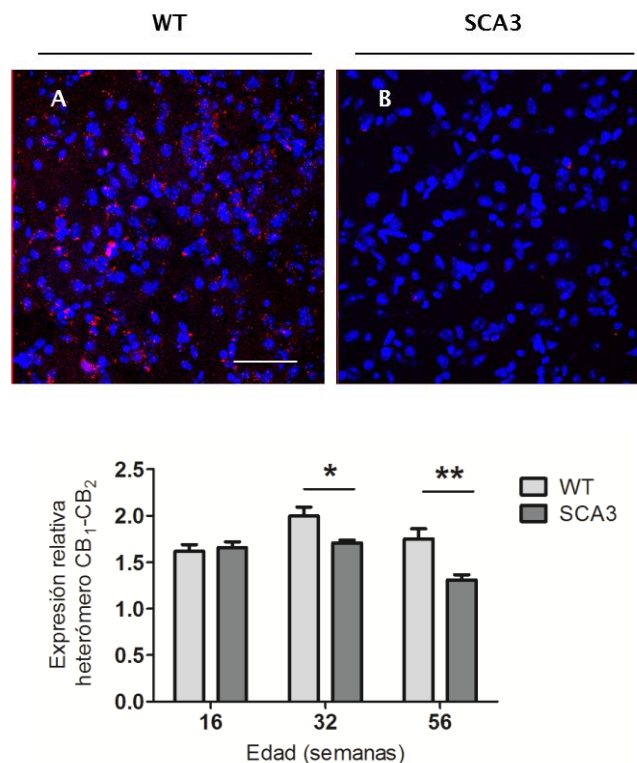


Figura 52. Heterómeros CB₁-CB₂ en el estriado de ratones SCA3 y WT mediante la técnica de PLA. Expresión de heterómeros CB₁-CB₂ en el estriado de ratones WT (A) y SCA3 (B) a las 56 semanas de edad. Análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas en los experimentos de PLA (C). Los datos corresponden a la media de 5 animales por grupo experimental \pm SEM. Los datos se representan como el valor r (relación del número de puntos por célula). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías seguido del test de Newman-Keuls. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control). Escala de las barras 50 μ m.

2.4. DISCUSIÓN PARCIAL

Aunque el objetivo de este grupo de experimentos era investigar el sistema endocannabinoide en un modelo experimental de la SCA3, antes de esto procedimos a caracterizar desde un punto de vista comportamental, bioquímico e histopatológico este modelo. Esta parte de nuestro estudio se hace necesaria, a nivel general, por la existencia de datos controvertidos en cuanto a las regiones cerebrales y los tipos de células afectadas en la enfermedad en los distintos modelos de animales de SCA3 generados hasta la fecha (Gould, 2012; Yamada et al., 2008). Es además, muy importante identificar los primeros cambios a nivel molecular (presumiblemente asociados a los síntomas motores más tempranos) para detectar donde afecta primero y con mayor magnitud la presencia de la proteína mutada, algo que ayudará a un mejor diseño de futuras estrategias terapéuticas. Además, existían razones más concretas para realizar esta caracterización y es que cuando recibimos las primeras parejas de ratones para desarrollar la colonia, procedentes del grupo de la Dra. Patricia Maciel, en nuestro laboratorio la caracterización de la progresión del fenotipo patológico en estos ratones todavía no había sido publicada, motivo por el que resultó muy interesante hacer esta caracterización en nuestra colonia de animales SCA3.

2.4.1. Evaluación del progreso de la enfermedad

Nuestros datos han demostrado que estos animales desarrollan de forma progresiva los síntomas motores típicos de la SCA3, de forma similar a los resultados obtenidos y publicados recientemente para este modelo por los investigadores que lo generaron en la Universidad de Minho, Portugal (Duarte-Silva et al., 2014; Silva-Fernandes et al., 2014).

Hemos visto que los ratones SCA3 ya presentan a las 7 semanas de edad una pérdida de fuerza de las extremidades, lo que se refleja en una disminución significativa en el tiempo en la rejilla o test de *hanging wire*. A las 15 semanas de edad los animales comienzan a desarrollar déficits en la prueba de la barra de equilibrio y a las 31 semanas de edad ya tiene descoordinación motora en el rotarod además de *claspings*. El análisis de la marcha en los animales transgénicos en edades más avanzadas (56 semanas) puso de manifiesto graves alteraciones. La actividad locomotora también se ve reducida en los ratones transgénicos en esta etapa. Es interesante destacar que la evolución de este fenotipo motor en los ratones SCA3 se correlaciona razonablemente bien con la evolución de los síntomas en los pacientes enfermos de este subtipo de SCA y algo que también ocurre al comparar con otros modelos animales de la enfermedad (Gould, 2012; Jacobi et al., 2013). Los estudios metabólicos realizados en estos animales mediante PET han demostrado además la existencia de hipometabolismo en el cerebelo, tronco encefálico, estriado y corteza cerebral de los animales transgénicos SCA3 en comparación con los controles, datos también en consonancia con los obtenidos por otros autores (Soong et al., 1997; Taniwaki et al., 1997).

El análisis de todos estos datos nos permitió definir la progresión de la enfermedad en tres estadios de la enfermedad: (i) una fase sintomática temprana (hasta las 16

semanas de edad), caracterizada por una disminución en la fuerza motora; (ii) una fase sintomática intermedia (desde las 16 hasta las 32 semanas), en la que se observan además alteraciones en la coordinación motora; y (iii) una fase avanzada de la enfermedad (desde las 35 hasta las 56 semanas de edad), en la que ya son evidentes varias anomalías motoras y un déficit en la actividad metabólica a nivel del cerebelo pero también de otras estructuras encefálicas.

Nuestros datos también han confirmado la presencia de la proteína mutada en el cerebelo de los animales SCA3 así como la presencia de inclusiones nucleares en varias estructuras del tronco encefálico, como el núcleo pontino y la oliva inferior. La presencia de inclusiones nucleares en estas estructuras ha sido descrita previamente en la SCA3, tanto en pacientes como en otros modelos animales de la enfermedad (Paulson et al., 1997).

A nivel histopatológico, nuestros datos revelan una degeneración selectiva en regiones específicas del encéfalo de los animales SCA3. En particular, hemos observado una aparente pérdida de neuronas en el núcleo dentado, núcleo pontino y estriado de los animales SCA3. Nuestros estudios en el modelo de SCA3 no han mostrado sin embargo alteraciones en cuanto al número de células de Purkinje y neuronas de la oliva inferior de acuerdo a lo descrito previamente para esta enfermedad que no está entre aquellos subtipos de SCA en los que la afectación de las células de Purkinje es relevante (Klockgether et al., 1998; Koeppen, 2005). Para concluir esto primero utilizamos el marcador calbindina, una proteína de unión a calcio. No vimos cambios en las células de Purkinje, pero sí que se observó un descenso de calbindina, en el núcleo dentado, algo que también se ha visto en el cerebelo de pacientes afectados por SCA3 y que se ha relacionado con la degeneración grumosa característica de esta enfermedad y localizada específicamente en este núcleo dentado (Koeppen et al., 2013). El descenso en la expresión de calbindina que hemos observado en el núcleo dentado sugiere la existencia de eventos tóxicos en las neuronas de estas estructuras que pueden ser responsables de contribuir a la muerte neuronal observada. La calbindina tiene una función como regulador de la concentración de calcio intracelular, de manera que una reducción de la expresión de esta proteína podría interpretarse como una reducción en la capacidad de las neuronas para amortiguar los niveles de calcio haciéndolas más sensibles frente a los eventos citotóxicos derivados de niveles elevados de calcio (Iacopino y Christakos, 1990).

Nuestros resultados han mostrado también un descenso de calbindina en el estriado de los ratones SCA3 en comparación los *wildtype*. Para determinar si este descenso se debía a la pérdida de neuronas, a cambios en la señalización por calcio o a ambos se analizó un marcador específico de las neuronas de proyección estriatal, DARPP-32, que son mayoritarias en el estriado. Nuestros datos han demostrado un descenso significativo en los niveles de ARNm para esta proteína a la edad de 56 semanas, lo que está en consonancia con la pérdida celular observada a esta edad y que pudimos medir mediante tinción con azul de metileno y con los datos previos obtenidos en otro modelo de la enfermedad (Alves et al., 2008). Sin embargo, es importante destacar que en el estriado, los cambios en la proteína calbindina aparecen previos a la pérdida del marcador neuronal DARPP-32 apoyando la idea de una disfunción de la señalización por calcio como parte de los mecanismos de neurodegeneración en esta enfermedad, como ya se ha postulado para otros tipos de SCAs (Kasumu y Bezprozvanny, 2012).

Una vez caracterizadas las alteraciones neuropatológicas características de la SCA3 en nuestro modelo animal quisimos investigar si la glía estaba también involucrada en el proceso degenerativo asociado a la enfermedad. Nuestros estudios de inmunohistoquímica no muestran

una clara activación glial, a excepción de pequeños cambios en la morfología de las células de microglía en zonas específicas del encéfalo, como el núcleo dentado en el cerebelo y el núcleo pontino del tronco del encéfalo. Esta ausencia de activación glial, al menos evidente, y por tanto de inflamación en el encéfalo de los animales SCA3 pudo ser confirmada mediante el análisis de los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α . Las únicas diferencias se encontraron en el tronco encefálico y en la etapa avanzada de la enfermedad y afectaba a la citoquina TNF- α , cuya expresión se incrementaría en los animales enfermos respecto a los *wildtype*.

Por otro lado, a pesar de no haber observado procesos de astrogliosis en el cerebro de los ratones SCA3 decidimos analizar la expresión de los transportadores de glutamato GLAST y GLT1, que actúan a nivel de estas células, en el encéfalo de estos animales. Además, esto nos permitía investigar otro de los procesos como la excitotoxicidad, potencialmente implicado en la degeneración en la SCA3, ya que se ha descrito alteraciones en varios elementos implicados en la transmisión glutamatérgica en las SCAs (Chou et al., 2008; Custer et al., 2006; Liu et al., 2009; Serra et al., 2004), entre ellos cambios directos en los niveles de los transportadores de glutamato, específicamente de GLAST (Custer et al., 2006; Cvetanovic, 2015). Los datos que hemos obtenido en el estudio de los ratones SCA3 confirman la existencia de alteraciones en los transportadores gliales GLAST y GLT1 en el encéfalo de los animales transgénicos SCA3. En concreto, se han observado cambios en el tronco encefálico, con un descenso en los niveles de los transportadores desde la fase intermedia de la enfermedad. También se vieron descensos de estos transportadores en el estriado, en este caso, desde la fase temprana de la enfermedad. Estos datos demuestran por tanto la existencia de posibles alteraciones en la transmisión mediada por glutamato en el cerebro de los animales SCA3, en particular en el tronco encefálico y en el estriado, alteraciones que seguramente subyacen a los procesos de excitotoxicidad descritos en esta enfermedad neurodegenerativa (Chou et al., 2008) y que pueden estar directamente involucrados en los mecanismos moleculares que intervienen en la atrofia neuronal observada en ambas estructuras.

Con estos datos demostramos que los ratones CMVMJD135 presentan muchas características fenotípicas y patológicas de la SCA3, que hacen que pueda servir como un buen modelo animal para estudiar la progresión de la enfermedad y los procesos patogénicos específicos involucrados en esa progresión. En nuestro caso, hemos utilizado este modelo para estudiar las posibles alteraciones que se dan en el sistema cannabinoide endógeno durante el inicio y la progresión de los síntomas en la SCA3. El modelo también podría servir en futuros estudios orientados a la evaluación de potenciales fármacos modificadores de la enfermedad (neuroprotectores), entre los que se pueden incluir los cannabinoides.

2.4.2. Análisis del sistema endocannabinoide

En el presente diseño experimental, hemos detectado cambios profundos en el patrón de expresión del receptor cannabinoide CB₁, de la enzima FAAH y de los ligandos endógenos AEA y OEA en las regiones encefálicas afectadas en la enfermedad en el ratón transgénico para la SCA3. En términos generales estos resultados concuerdan con los datos previos obtenidos previamente en las muestras de tejido *post mortem* de pacientes afectados de SCA de nuestro

estudio y también a los obtenidos en pacientes y en varios modelos animales de otra poliglutaminopatía como es la enfermedad de Huntington (Bisogno et al., 2008; Blázquez et al., 2011; Dowie et al., 2009; Pazos et al., 2008).

El estudio de los receptores cannabinoide CB_1 y CB_2 en los ratones SCA3 nos ha indicado que el receptor CB_1 experimenta un incremento en el cerebelo de estos animales en la fase avanzada de la enfermedad. Este aumento de expresión se localiza en la corteza cerebelosa, específicamente en las formaciones tipo pincel de las células en cesto. Unos resultados que están en consonancia con los estudios previos realizados en muestras *post mortem* de pacientes afectados de SCA, en los que también observamos un incremento en la expresión del receptor CB_1 en estos terminales. Como ya se comentó en la Introducción, el incremento de receptores CB_1 en las formaciones tipo pincel produce una excesiva inhibición de la liberación de GABA en la sinapsis entre las interneuronas y las células de Purkinje. La consecuencia de este exceso de inhibición sería un exceso de excitación de las células de Purkinje, por parte de las fibras paralelas y las fibras trepadoras que llegan a ellas, produciendo la inhibición de los núcleos profundos del cerebelo. Se ha descrito que alteraciones a nivel de los núcleos profundos del cerebelo producen síntomas de disfunción cerebelosa (Modianos y Pfaff, 1976; O'Hearn y Molliver, 1997; Poirier et al., 1974). En base a estos datos la sobreexpresión de los receptores CB_1 podríamos interpretarla como una respuesta que podría contribuir a los síntomas de disfunción cerebelosa observados en las fases avanzadas de la enfermedad. Esta hipótesis estaría en consonancia con datos previos que han demostrado que la activación de los receptores CB_1 del cerebelo produce ataxia en algunas especies animales (DeSanty y Dar, 2001; Patel y Hillard, 2001). Es posible, por tanto, que el aumento de los receptores CB_1 que hemos observado en el cerebelo de los ratones SCA3 esté relacionado con los problemas en la coordinación motora que se dan en las fases avanzadas de estas enfermedades, algo que también se ha sugerido en el anterior diseño experimental ya que también se observó un aumento de los receptores CB_1 en los pacientes de varios tipos de SCA.

Además de alteraciones en el cerebelo, nuestros resultados han mostrado cambios profundos en la expresión del receptor CB_1 en el estriado de los ratones SCA3. En particular, nuestros datos han mostrado descensos en los niveles de ARNm para este receptor en el estriado a partir de las 32 semanas de edad, una edad en la que, por otro lado, ya mostramos previamente la existencia de disfunción en la señalización por calcio (medido por una reducción en la proteína calbindina) y procesos de excitotoxicidad (medidos por un descenso en los niveles de los transportadores de glutamato GLAST y GLT1). A las 56 semanas de edad, el descenso en los niveles de ARNm para el receptor CB_1 se hace más evidente pudiéndose observar también una pérdida de expresión para la proteína CB_1 asociada a una pérdida de neuronas de proyección estriatal (medido por una disminución de los niveles de DARPP32). El hecho de encontrar alteraciones, que incluso puedan reflejar muerte neuronal, en el estriado en un modelo de SCA3 no es un hecho extraño ya que las SCA3 está entre las ataxias dominantes que no presentan de forma exclusiva daño a nivel del cerebelo, sino también sintomatología extrapiramidal, por tanto, posible disfunción/degeneración de los ganglios basales. De hecho, lo que vemos en el estriado de los ratones SCA3 recuerda bastante a lo que ocurre en esta estructura en otra poliglutaminopatía que afecta de forma preferente a los ganglios basales, como la enfermedad de Huntington. También en la enfermedad de Huntington se observan descensos en los niveles de CB_1 en el estriado, tanto en pacientes como en distintos modelos

animales de esta enfermedad de Huntington (Fernández-Ruiz et al., 2011). De hecho, en la enfermedad de Huntington se ha observado un descenso del receptor CB₁ desde la fase presintomática de la enfermedad, cuando todavía no hay o apenas hay muerte celular (Glass et al., 2000). Esto ha llevado a considerar que la pérdida de receptores CB₁ no sólo es consecuencia de la muerte progresiva de las neuronas del estriado, donde este receptor está localizado, sino que podría estar implicada en la propia patogénesis de la enfermedad. Se ha postulado que puesto que la activación de los receptores CB₁ produce la inhibición de la liberación de glutamato, el descenso en los niveles de este receptor en la enfermedad favorecería los procesos de excitotoxicidad (Fernández-Ruiz et al., 2011). Es posible que algo similar esté ocurriendo en el modelo de SCA3. Esto nos lleva a proponer a este receptor cannabinoide como un posible biomarcador para la monitorización del comienzo y la progresión de la SCA3., algo que se podría hacer incluso en pacientes con técnicas de imagen al existir ligandos fluorados para estudios de PET.

Sorprendentemente, en el cerebro de los ratones SCA3 no hemos observado el típico aumento de expresión del receptor CB₂ que vimos en los pacientes con SCAs y que también se ha visto en modelos animales de otras enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009), la enfermedad de Parkinson (García et al., 2011; Gómez-Gálvez et., 2015) o la esclerosis lateral amiotrófica (Espejo-Porras et al., 2015; Moreno-Martet et al., 2014; Yiangou et al., 2006), entre otras. Este incremento del receptor CB₂ observado en los procesos neurodegenerativos se ha relacionado con las células de glía, como una respuesta protectora endógena que tiene como finalidad reducir los efectos tóxicos mediados por estas células (Fernández-Ruiz et al., 2007) especialmente la microglía reactiva. Ya que en los ratones SCA3 parece evidente que no hay respuesta de activación glial como lo demuestran los inmunohistoquímicos para los marcadores gliales GFAP e IBA-1, así como el análisis de la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , es lógico pensar que la falta de activación del receptor CB₂ en estos ratones se debe a este hecho.

Por otro lado, en el presente trabajo, además de los receptores cannabinoides, también se han estudiado las posibles alteraciones de las enzimas del metabolismo de endocannabinoides en el encéfalo de los animales SCA3. Nuestros datos no han mostrado diferencias en cuanto a las enzimas de síntesis de estos ligandos, pero sí se han observado alteraciones en la enzima de degradación de endocannabinoides FAAH. Estos cambios, a diferencia de los observados para el receptor CB₁, se dan ya en las fases tempranas de la enfermedad. En particular, nuestros experimentos de inmunohistoquímica muestran un aumento de la enzima FAAH en el encéfalo de los ratones SCA3. Estos cambios los hemos observado en las células de Purkinje, en todas las edades estudiadas, siendo más evidente en la fase temprana de la enfermedad (16 semanas de edad). Estos datos son similares a los obtenidos en el estudio del sistema cannabinoide endógeno en el cerebelo de pacientes afectados de SCA, en los que también vimos un aumento de expresión de la enzima en las células de Purkinje. Este aumento temprano de la enzima FAAH es complementario al aumento de expresión del receptor CB₁ observado en las fases avanzadas de la enfermedad sugiriendo que, quizás, el aumento de la enzima es un elemento previo en la patogenia de la enfermedad y el incremento del receptor es una respuesta adaptativa para intentar compensar el descenso del tono endocannabinoide a nivel de las células de Purkinje.

Por otro lado, también hemos observado un aumento en la expresión de la enzima FAAH en el tronco encefálico de los ratones SCA3, esta vez en las fases temprana e intermedia de la enfermedad. Sorprendentemente estas diferencias desaparecen en la fase avanzada, sugiriendo la posibilidad de que se active un mecanismo adaptativo por parte de los circuitos neuronales implicados. Los cambios en la enzima FAAH, preferentemente en las fases tempranas de la enfermedad, apoyan la idea de la implicación de esta enzima en los mecanismos de neurodegeneración que se dan en la enfermedad. En particular, un incremento de la enzima FAAH puede producir un descenso de los niveles de endocannabinoides y de sus efectos a nivel del receptor CB₁ limitando el papel neuroprotector de este receptor en los procesos de excitotoxicidad que, por otro lado, hemos visto se pueden derivar en el tronco encefálico de los ratones SCA3 de los cambios en el transportador de glutamato GLT-1.

En el estriado, en cambio, el aumento de los niveles de la enzima FAAH en los animales SCA3 comienza en la fase intermedia de la enfermedad. En la fase avanzada, a pesar de haber un menor número de células, las células supervivientes presentan una mayor inmunorreactividad para la enzima FAAH. Como ya se ha dicho, un aumento similar de esta enzima en el estriado en fases avanzadas de la enfermedad se ha descrito también en modelos animales y en tejido *post mortem* de pacientes con enfermedad de Huntington (Blázquez et al., 2011).

Que se hayan detectado cambios a nivel de las enzimas del metabolismo de endocannabinoides implica que los niveles de estos ligandos deberían estar también alterados. Esto se investigó gracias a la estancia breve que pude realizar en el laboratorio de la Dra. Cecilia Hillard, en el medical College of Wisconsin, en EEUU. En concreto, se analizaron los niveles de AEA, OEA y PEA así como la del 2-AG y el 2-OG. De estos cinco derivados lipídicos, solo dos, la AEA y el 2-AG tienen actividad intrínseca dentro del sistema endocannabinoide por su capacidad de activar los receptores CB₁ y CB₂, por tanto, los NAES como el 2-OG, que no tiene esta capacidad, sí que pueden indirectamente afectar a la actividad endocannabinoide a través de compartir las mismas enzimas que la AEA y el 2-AG, de forma que ejercen un efecto modulador denominado en inglés "*entourage effect*". Las únicas diferencias que observamos fueron en la AEA y en la OEA, solo en el tronco encefálico, y siempre en las fases tempranas e intermedias de la enfermedad, pero no en la etapa más avanzada. Estos resultados están en consonancia con el aumento de expresión para la enzima FAAH observado en esta estructura a esas edades.

Al igual que ocurría para el receptor CB₁ y para la enzima FAAH, los cambios en los niveles de AEA observados en los ratones SCA3 se han demostrado también en modelos animales de la enfermedad de Huntington (Bisogno et al., 2008; Dowie et al., 2009; Lastres-Becker et al., 2001). La reducción en los niveles de endocannabinoides en esta enfermedad se ha relacionado con una actividad baja a nivel de la señalización mediada por el receptor CB₁ (Bisogno et al., 2008). A pesar de que en los ratones SCA3 no hemos observado diferencias en la expresión del receptor CB₁ en esta estructura cerebral, se ha podido pensar que, de la misma manera que en la enfermedad de Huntington, la disminución de los niveles de endocannabinoides en la fase presintomática puede dar lugar a la pérdida de protección ante los eventos de excitotoxicidad que deberían ser limitados por la acción de los receptores CB₁. En base a eso se podría pensar que la progresión de la enfermedad en los ratones SCA3 podría limitarse a través de elevar los niveles de endocannabinoides con inhibidores de la FAAH.

En cuanto a la disminución de los niveles de OEA y a la vista de los efectos neuroprotectores atribuidos a este compuesto (Galán-Rodríguez et al., 2009; Gonzalez-Aparicio et al., 2014), se podría pensar que podría: (i) los bajos niveles de OEA podrían contribuir a la progresión de la enfermedad; y (ii) ya que la OEA también es un sustrato para la enzima FAAH (Fowler, 2004), también en este caso el uso de inhibidores de la FAAH podría resultar beneficioso en los ratones SCA3 a través de elevar los niveles de esta NAE.

Es importante destacar que en nuestros estudios no hemos encontrado diferencias en los niveles del 2-AG y el 2-OG en el encéfalo de los animales SCA3. Estos resultados no son sorprendentes ya que no es raro que los dos principales endocannabinoides sean regulados de diferente manera en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. Esto se ha visto de nuevo en la enfermedad de Huntington (Lastres-Becker et al., 2001) y podría ocurrir también en el caso de la SCA3.

Por lo tanto, con estos estudios, hemos descrito por primera vez la existencia de alteraciones importantes en varios elementos clave del SCE en el encéfalo de ratones SCA3. De forma particular, nuestros datos han mostrado alteraciones evidentes a nivel del metabolismo de endocannabinoides a través de la enzima FAAH también en la señalización endocanabinoide mediada por el receptor CB_1 en las áreas afectadas por la enfermedad. Con respecto a esto último y con idea de profundizar más en el papel de este receptor en la patogenia de la SCA3, en la presente tesis doctoral también la formación de heterómeros del receptor CB_1 con otros receptores del mismo sistema (CB_2) o de otros sistemas de neuromodulación (A_{2A}) en las estructuras cerebrales que se ven afectadas en la enfermedad.

2.4.3. Estudio de la formación de heterómeros de los receptores cannabinoides

Nuestros datos han demostrado por primera vez la formación de heterómeros CB_1 - A_{2A} en el cerebelo y tronco encefálico de ratones *wildtype*, unos datos que están en consonancia con los datos previamente obtenidos en el estriado y el globo pálido de rata (Carriba et al., 2007). Nuestro trabajo demuestra, además, la existencia de alteraciones en estos complejos en la SCA3, en concreto, en este trabajo observamos una marcada reducción en la formación de heterómeros CB_1 - A_{2A} en la fase avanzada de la enfermedad, pérdida que se observa en las tres estructuras analizadas (cerebelo, núcleo pontino y estriado).

Aunque es poco lo que se conoce sobre los heterómeros en las enfermedades degenerativas existen evidencias de alteraciones en estos complejos durante el curso de los trastornos neurológicos. En este sentido, estudios recientes en monos parkinsonianos han descrito que el tratamiento con levodopa produce un descenso en la formación del heterotrímero A_{2A} - CB_1 - D_2 en el núcleo caudado (Bonaventura et al., 2014). A pesar de que los autores no concluyen si la pérdida del complejo es causa o consecuencia de la disquinesia asociada al tratamiento sus datos evidencian por primera vez la expresión alterada de heterómeros durante el curso de una enfermedad y sugieren que, quizás, fármacos dirigidos a estos complejos pueden tener éxito para normalizar los circuitos de los ganglios basales o para prevenir los efectos secundarios inducidos por la levodopa (Bonaventura et al., 2014). Además de este trabajo, estudios aún no publicados han mostrado un descenso en la formación del complejo CB_1 - A_{2A} en modelos animales y en muestras *post mortem* de pacientes afectados por la

enfermedad de Huntington. En este punto es importante destacar que aunque todavía son datos muy preliminares, la pérdida del heterómero CB_1 - A_{2A} también parece darse en las muestras *post mortem* humanas de pacientes de SCAs. En concreto, los experimentos realizados muestran una casi completa expresión de estos heterómeros en el paciente de SCA3 y SCA7 (datos no mostrados). Estos datos sugieren que quizás los cambios en la formación del heterómero CB_1 - A_{2A} pueden ser un patrón común de respuesta ante el daño en el SN en las enfermedades neurodegenerativas causadas por la presencia de poliQs.

Por otro lado, estudios previos han descrito la participación del heterómero CB_1 - A_{2A} en los efectos depresores de los cannabinoides sobre la actividad motora (Carriba et al., 2007). Estos autores han postulado que la señalización del receptor CB_1 en el estriado depende completamente de la interacción física y funcional con el receptor A_{2A} (Carriba et al., 2007). Es posible, por tanto, que la pérdida del complejo CB_1 - A_{2A} que hemos observado puede estar directamente relacionado con los síntomas motores asociados a la patología. Esta hipótesis estaría en concordancia además con los datos que demuestran que el doble KO para A_{2A} y CB_1 presenta una actividad espontánea reducida (Berrendero et al., 2003), de forma similar a la que se observó en los animales modelo de SCA3 en fase más avanzada de la enfermedad, cuando se observa una reducción en la formación de este tipo de complejo heterodimérico.

Además de los heterómeros CB_1 - A_{2A} se analizó la presencia de heterómeros del receptor CB_1 con el receptor CB_2 . La formación de estos heterómeros se ha identificado en un modelo celular neuronal y en cerebro de rata, en el núcleo acumbens y globo pálido (Callén et al., 2012). Nuestros resultados demuestran por primera vez la presencia de heterodímeros CB_1 - CB_2 en el cerebelo y núcleo pontino de ratones sanos. Al igual que ocurría en el caso del complejo CB_1 - A_{2A} , nuestros resultados muestran una fuerte caída del heterómero CB_1 - CB_2 en el cerebro de los ratones SCA3. En este caso, la pérdida de heterómeros CB_1 - CB_2 se observa desde la fase intermedia de la enfermedad en todas las estructuras analizadas (cerebelo, tronco encefálico y estriado). Este descenso en la expresión de los heterómeros CB_1 - CB_2 se ha observado también en la corteza y en el estriado de modelos animales de la enfermedad de Huntington (datos no publicados). De esta manera, una vez más, nuestros datos están en la misma línea de los observados en esta otra enfermedad neurodegenerativa causada por la presencia de poliQs. La presencia de alteraciones en los niveles de este heterómero en la fase intermedia de la enfermedad sugiere su participación en los procesos que llevan a la degeneración neuronal pudiendo ser responsables también de los síntomas. Es importante destacar que la pérdida del heterómero CB_1 - CB_2 es un evento previo a la pérdida del heterómero CB_1 - A_{2A} , sugiriendo distintos mecanismos de respuesta de estos complejos de receptores frente a la situación de daño.

A modo de conclusión de esta parte en la que se estudió el sistema endocannabinoide en un modelo murino de SCA3, se puede decir que se ha descrito por primera vez la existencia de alteraciones importantes en varios elementos clave en la señalización cannabinoide en las regiones encefálicas afectadas en esta enfermedad. En concreto, nuestros análisis muestran importantes alteraciones a nivel del receptor CB_1 y de la enzima FAAH así como alteraciones en la formación de heterómeros de los receptores CB_1 con los receptores de adenosina A_{2A} , y con los receptores CB_2 en las regiones cerebrales afectadas en la SCA3. Estos hallazgos establecen las bases para el uso de este sistema de comunicación celular como una potencial diana para el tratamiento de estas enfermedades neurodegenerativas.

V. DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de patologías complejas que tienen como características comunes el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración de poblaciones neuronales específicas en diferentes regiones del sistema nervioso que desemboca en incapacidad física y psíquica produciendo en último término la muerte del paciente. En este sentido, las SCAs constituyen grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas principalmente por la disfunción del cerebelo y de sus conexiones aferentes y eferentes pero con la afectación variable de otras áreas como el tronco, la médula espinal, el hipotálamo, el tálamo, los ganglios basales, la corteza cerebral, el sistema nervioso periférico o la retina. Esta múltiple afectación se traduce en la presencia de características clínicas muy variables. Así, los pacientes afectados de SCA, presentan una falta de equilibrio (principalmente al caminar), descoordinación de las extremidades superiores, deterioro en el control de movimientos voluntarios, pérdida de masa muscular, trastornos oculares, síntomas extrapiramidales, además de alteraciones psiquiátricas y cognitivas como depresión y demencia (Manto, 2005). Como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, la eficacia de los tratamientos farmacológicos ensayados en las SCAs es aún muy limitada no existiendo en la actualidad ningún tratamiento que resulte efectivo en el alivio de los síntomas y, en particular, que modifique la progresión de la enfermedad. Por este motivo, existe una importante necesidad de buscar nuevas terapias dirigidas a frenar o al menos enlentecer, la progresión de la enfermedad. Los cannabinoides, a través de la modulación del sistema cannabinoide endógeno, podrían servir en el tratamiento de estas enfermedades en base a sus propiedades neuroprotectoras capaces de reducir procesos citotóxicos como la excitotoxicidad, el daño oxidativo o la inflamación y de regular la supervivencia neuronal. Además, los cannabinoides resultarían interesantes en las SCAs por su capacidad de regular la transmisión sináptica de los circuitos neuronales implicados en estas enfermedades.

El objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido profundizar en el potencial del sistema cannabinoide endógeno como posible diana neuroprotectora en las SCAs, concretamente en aquellas causadas por la presencia de proteínas con tracto de poliQs, las formas más prevalentes de estas enfermedades.

Como punto de partida para un posible tratamiento basado en cannabinoides en estas enfermedades es necesario identificar el tipo de cambios que el desarrollo de la degeneración cerebelosa produce en elementos específicos del sistema de señalización endocannabinoide. Conocer los cambios en los principales elementos de este sistema de señalización, como los receptores cannabinoides, sus ligandos o las proteínas responsables de regular su disponibilidad, es de suma importancia ya que estos elementos son los objetivos potenciales para una acción farmacológica con cannabinoides. Conocer una posible desregulación de este sistema de señalización debería ayudar a un mejor diseño de una potencial terapia para detener y/o retrasar la progresión de la degeneración cerebelosa en las SCAs.

Por ello, en esta Tesis Doctoral quisimos conocer los cambios que se dan en el sistema cannabinoide en este tipo de enfermedades.

En este sentido, y pesar de que varios estudios previos ya habían demostrado la existencia de alteraciones en varios de elementos del sistema endocannabinoide en muestras de tejido *post mortem* de varias enfermedades neurodegenerativas crónicas como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Fernández-Ruiz et al., 2014), hasta la fecha no se habían realizado estudios similares en

muestras de tejido de afectados por algún tipo de SCA. Por ello, el primero objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar, sobre muestras de cerebelo *post mortem* de pacientes afectados por algunos de los tipos de SCA más prevalentes, el estado del sistema endocannabinoide y su posible desregulación.

Nuestros resultados han demostrado la existencia de alteraciones importantes en el patrón de expresión de los receptores CB₁ y CB₂, así como de las enzimas FAAH y MAGL en el cerebelo de pacientes afectados de SCA. Por un lado, se ha visto un incremento en la expresión de estos elementos del sistema cannabinoide endógeno en las células que degeneran en este tipo de patologías (las células de Purkinje y las neuronas del núcleo dentado) lo que en principio podría indicar la participación del sistema endocannabinoide en los procesos neurodegenerativos que se dan en la enfermedad, bien como una respuesta endógena de las células que están degenerando para intentar compensar los procesos de excitotoxicidad y estrés oxidativo característicos o bien se puede relacionar con los propios mecanismos patogénicos subyacentes a la enfermedad (Fernández-Ruiz et al., 2011). Por otro lado, nuestros datos han demostrado también un incremento en la expresión de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y de las enzimas FAAH y MAGL en elementos gliales en el cerebelo de enfermos de SCA, principalmente en células de microglía, pero también en astrocitos, lo que podría indicar que el sistema endocannabinoide se hiperactiva en las células gliales bajo las condiciones de daño celular (Pazos et al., 2005) de forma similar a lo observado previamente en otras enfermedades neurodegenerativas y que se ha relacionado con una respuesta protectora endógena de este sistema de señalización que está dirigida a aminorar los procesos de citotoxicidad que subyacen al daño neuronal (Fernández-Ruiz et al., 2014). En base a esto la expresión glial de estos elementos del SCE podría actuar como marcador de inflamación en el SNC en estas enfermedades y también servir de posible diana farmacológica para modular esta respuesta glial en el sentido de potenciar los efectos beneficiosos de estas células e inhibir la producción de mediadores citotóxicos. En este sentido se ha propuesto al receptor CB₂ como una potencial diana farmacológica para el tratamiento de varias enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2008), la presencia de FAAH en astrocitos y su posible participación en los procesos neurodegenerativos en este tipo de enfermedades ha sugerido que quizás la inhibición de FAAH podría tener efectos beneficiosos para el tratamiento de estas enfermedades (Benito et al., 2003; Karanian et al., 2005).

En relación a los cambios observados para los receptores cannabinoides es importante destacar que aunque ya se ha observado un incremento de estos elementos en otras enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz et al., 2014) esta es la primera vez que se ve una respuesta al alza en las neuronas que degeneran en la enfermedad, unos datos que son especialmente llamativos en el caso del receptor CB₁. Este receptor en el cerebelo se localiza de forma abundante en los terminales que sinaptan con las células de Purkinje de forma que se le han atribuido importantes funciones reguladoras sobre la transmisión sináptica de estas células, las cuales constituyen la única eferencia de la corteza cerebelosa y por tanto tienen un papel fundamental en el correcto procesamiento de las señales que llegan al cerebelo. En nuestros estudios el aumento de CB₁ se ha identificado en los terminales de las células inhibitorias que llegan a las células de Purkinje y sorprendentemente también en el cuerpo celular de las células de Purkinje, unas células que en condiciones normales carecen de este receptor. Debido a que la activación anormal de las células de Purkinje ocasiona síntomas de disfunción cerebelosa

(O'Hearn and Molliver, 1997) se podría pensar que el exceso de inhibición, mediado por el receptor CB₁, en las células de Purkinje de los casos de SCA estaría relacionado con los problemas de coordinación motora descritos en estos pacientes. Estos datos estarían en concordancia con datos previos que han demostrado que la activación del receptor CB₁ en el cerebelo produce alteraciones en la coordinación motora (Patel and Hillard, 2001). Esta hipótesis apoya la idea de que el sistema endocannabinoide podría ser una posible diana terapéutica para el tratamiento sintomático de las SCAs. En este sentido, y aunque son necesarios más estudios que determinen la implicación del receptor CB₁ en los síntomas motores presentes en las SCAs, una primera aproximación sugiere que si la sobreactivación del receptor CB₁ produce incoordinación motora quizás el uso de antagonistas CB₁ podría ser útil en el tratamiento sintomático de estas enfermedades.

Por otro lado, los resultados obtenidos para el receptor CB₂ aportan un dato más acerca del papel de este receptor cannabinoide a nivel neuronal ya que como se ha comentado anteriormente durante mucho tiempo se creyó que este receptor era un receptor eminentemente glial, aunque cada vez más trabajos sugieren la presencia de este receptor en algunas subpoblaciones neuronales del el cerebelo, tallo cerebral y en el mesencéfalo (García et al., 2015; Lanciego et al., 2011; Van Sickle et al., 2005; Skaper et al., 1996). Es importante destacar que esta es la primera vez que se ha descrito la inducción de este receptor en neuronas ante una situación de daño en el SNC.

De modo global en el cerebelo de los pacientes de SCA hay un aumento en la señalización endocannabinoide mediada por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, junto a una presumible reducción en los niveles de endocannabinoides debido a una mayor degradación de estos por las enzimas FAAH y MAGL. Estos dos hechos, que pueden parecer contrarios, se podrían interpretar como un mecanismo compensatorio de este sistema para intentar mantener la homeostasis, es decir, habría un primer efecto primario (por ejemplo el aumento de los receptores CB₁ y CB₂), y una respuesta secundaria compensatoria (el incremento en los niveles de las enzimas de degradación), que tendría como objetivo reducir la disponibilidad de los ligandos endocannabinoides por parte de los receptores cannabinoides para recuperar la señalización endocannabinoide normal. Aunque también es posible la explicación contraria (efecto primario el aumento de las enzimas que inactivan los endocannabinoides que produciría una respuesta compensatoria para intentar reducir la señalización mediada por los receptores cannabinoides). Los tejidos *post mortem* utilizados en nuestro estudio correspondían a pacientes en las fases terminales de la enfermedad por lo que no es posible con estos datos identificar cuál es el efecto primario y cual la respuesta compensatoria que se da en las SCAs. Por este motivo, el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de los cambios que se pudieran dar en el sistema cannabinoide endógeno durante la progresión de la enfermedad. Para ello se utilizó un modelo animal del subtipo más prevalente de SCA, la SCA3, en el que se analizó el estado del sistema cannabinoide en tres estadios diferentes de la progresión de la enfermedad (una fase sintomática temprana, una fase intermedia y una fase avanzada). Nuestros estudios en este modelo de SCA3 han descrito por primera vez la existencia de alteraciones importantes en varios elementos clave en la señalización cannabinoide en las regiones encefálicas que se ven afectadas en este subtipo de SCA (cerebelo, tronco encefálico y estriado). La desregulación del sistema encocannabinoide en el encéfalo de los ratones SCA3 se

ha visto principalmente en relación al receptor CB₁ y a la enzima FAAH y son selectivos en función de la estructura cerebral y la edad analizada.

El estudio del cerebelo de estos animales ha mostrado resultados similares a los mostrados previamente con las muestras de pacientes de SCA. En este sentido, en el cerebelo de los ratones de SCA3 en la fase más avanzada de la enfermedad se ha observado un incremento en los niveles del receptor CB₁ localizados de forma específica en los terminales de las células en cesto, sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en los pacientes de SCA, en este caso no se ha identificado el receptor CB₁ en el cuerpo celular de las neuronas de Purkinje. Estas diferencias se podrían explicar porque los ratones SCA3 no presentan una evidente afectación de estas neuronas lo que apoyaría la idea de que el aumento de expresión para el receptor CB₁ en las células de Purkinje es un proceso íntimamente relacionado con la degeneración de estas células. No obstante, a pesar de no observar la inducción del receptor CB₁ en las células de Purkinje del cerebelo, el incremento de este receptor en los terminales de la interneuronas inhibitorias que regulan las sinapsis de las células de Purkinje apoyan la idea de la implicación del receptor en los síntomas motores observados en los ratones SCA3 en ese estadio de la enfermedad, desde que se ha propuesto que el receptor CB1 en estos terminales

Respecto a la enzima FAAH, en la fase más avanzada de la enfermedad los ratones transgénicos también presentan un incremento de expresión de esta enzima en las células de Purkinje, en consonancia con lo que se ha visto en las muestras de tejido de pacientes afectados de SCA. Estas alteraciones se han visto en estos animales en la fase avanzada de la enfermedad pero parece ser que tienen más importancia en las fases iniciales de la enfermedad, en contraste con los cambios observados en el receptor CB₁ que son exclusivos de la fase avanzada de la enfermedad, unos datos que sugieren que, quizás, como se ha comentado previamente, el aumento de la enzima es un elemento previo en la patogenia de la enfermedad y el incremento del receptor es un mecanismo de respuesta para intentar compensar el descenso del tono endocannabinoide a nivel de las células de Purkinje. Si bien son necesarios más estudios que confirmen esta hipótesis y el papel del receptor CB₁ en la disfunción cerebelosa característica de estos pacientes.

Respecto a las otras estructuras encefálicas estudiadas en este modelo de la enfermedad, se han descrito cambios tempranos en la enzima FAAH en el cerebelo pero principalmente en el tronco encefálico, donde parecen estar asociados a procesos de excitotoxicidad, apoyando la idea de la implicación de esta enzima en los mecanismos de neurodegeneración que se dan en la enfermedad en estas estructuras cerebrales, que por otro lado se ha descrito son las primeras que degeneran en la enfermedad (Soong y Liu, 1998). La importancia de estos cambios se ve apoyada por los resultados donde se ha visto que de forma paralela al incremento en los niveles de FAAH hay un descenso en los ligandos AEA y OEA en el tronco encefálico de los animales modelo de SCA3. La reducción en los niveles de estas NAEs, se podría explicar por un incremento en la expresión de FAAH, lo que daría lugar a la pérdida de protección ante los eventos de excitotoxicidad que en condiciones normales deberían ser limitados por la acción de los receptores CB₁. En el caso de la OEA, además, en base a los efectos neuroprotectores atribuidos a este compuesto (Galán-Rodríguez et al., 2009; Gonzalez-Aparicio et al., 2014), se podría pensar niveles bajos de OEA podrían también contribuir a la progresión de la enfermedad. En base a esto los cambios observados en relación a la enzima FAAH en esta estructura podrían estar directamente implicados en la patogenia de la enfermedad sugiriendo

que, quizás, la elevación de los niveles de endocannabinoides con inhibidores de la FAAH podría resultar beneficioso para intentar limitar la progresión de la enfermedad.

En el estriado, también se han descrito importantes cambios en los niveles de expresión del receptor CB_1 y de la enzima FAAH. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en el cerebelo las respuestas mediadas por ambos elementos del sistema cannabinoide son opuestas en esta estructura cerebral. De esta manera, los niveles del receptor CB_1 se ven notablemente reducidos en el estriado de los ratones SCA3 mientras que los de la enzima FAAH se encuentran elevados en esta estructura cerebral ya desde la fase intermedia de la enfermedad, cuando se han observado otros signos de neurodegeneración en esta estructura como posibles alteraciones en la homeostasis del calcio y del glutamato. Estas observaciones podrían interpretarse por un lado como una participación directa de este sistema en los mecanismos neurodegenerativos que conducen a la muerte neuronal en esta estructura cerebral pero, también, con alteraciones producidas como consecuencia de la degeneración asociada.

Por último, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han demostrado la existencia de alteraciones en la formación de los heterómeros CB_1 - A_{2A} , y CB_1 - CB_2 en las regiones cerebrales afectadas en la SCA3. En particular se ha visto un drástico descenso en la formación de ambos complejos en todas las regiones estudiadas en las fases sintomáticas de la enfermedad, unos datos que apoyan la idea de la implicación de este sistema, y en particular la de los receptores cannabinoides, en los procesos degenerativos que se dan en las fases avanzadas de la enfermedad sugiriendo su implicación en los síntomas motores observados. Esta hipótesis cobraría más importancia en el caso de los heterómeros CB_1 - A_{2A} , desde que se sabe que estos complejos median efectos sobre la actividad motora (Carriba et al., 2007). Si la pérdida del complejo CB_1 - A_{2A} que hemos observado en el encéfalo de los animales SCA3 está directamente relacionada con los síntomas motores asociados a la patología, quizás un tratamiento dirigido a estos complejos podría tener éxito para el tratamiento de los síntomas característicos de estas enfermedades, como ya se ha postulado para otras alteraciones neurológicas en las que se ha observado alteraciones en la formación de complejos heteroméricos de los receptores cannabinoides, especialmente el receptor CB_1 (Bonaventura et al., 2014).

Es importante destacar que en términos generales nuestros resultados muestran muchas similitudes con lo descrito previamente para otra enfermedad causada por repetición de glutaminas como es la enfermedad de Huntington. Estas semejanzas parecen sugerir un mecanismo común de respuesta del sistema de señalización cannabinoide en las enfermedades causadas por repetición de poliQs.

Como conclusión proponemos que, en base a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, el sistema cannabinoide endógeno se encuentra alterado en el transcurso de la enfermedad. Nuestros resultados indican la existencia de varios tipos de respuesta asociadas principalmente a la señalización mediada por el receptor CB_1 así como de la principal enzima de degradación de endocannabinoides, la enzima FAAH. Por un lado, los datos obtenidos parecen indicar cambios en los niveles de expresión de FAAH en las fases iniciales de la enfermedad, cuando todavía las alteraciones motoras no son muy evidentes. Por otro lado, se ha visto una respuesta del sistema endocannabinoide, que involucra a los receptores CB_1 y la formación de heterómeros de este receptor, en las fases sintomáticas de la enfermedad sugiriendo la posible

implicación de este sistema de señalización en los síntomas de motores asociados a estas enfermedades.

En conclusión, los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto el sistema cannabinoide, y las alteraciones que sufren sus componentes, podrían ser una potencial diana terapéutica en las SCAs. No obstante, a pesar de que son necesarios más estudios que permitan aclarar las causas de estos cambios en el sentido de si el sistema cannabinoide participa directamente en los procesos patogénicos de la enfermedad o es una consecuencia de los mismos, nuestros datos establecen las bases para un nuevo campo de investigación relacionado con el potencial neuroprotector de los cannabinoides y del sistema cannabinoide endógeno en estas patologías.

V.I. CONCLUSIONES

Nuestros estudios en los ratones transgénicos SCA3 confirman una alteración significativa en el sistema de señalización endocannabinoide en las estructuras encefálicas más importantes afectadas en este tipo de ataxia, lo que sugiere que quizás este sistema de señalización proporcione biomarcadores para la identificación de la enfermedad así como que la manipulación farmacológica dirigida a corregir los cambios en la señalización endocannabinoide podría ser una opción prometedora en la SCA3, así como en otras SCAs causados por la expansión polyQ.

En resumen, las conclusiones de esta tesis son:

1. El sistema de señalización endocannabinoide se altera significativamente en el cerebelo de los pacientes afectados por algún tipo de SCA causada por repeticiones poliglutaminas. Los cambios observados muestran el mismo tipo de respuesta (aumento) en todos los elementos cannabinoides analizados (es decir, los receptores CB₁ y CB₂ y las enzimas FAAH y MAGL).
2. Este aumento en la expresión de los receptores para cannabinoides y de las enzimas de degradación de endocannabinoides se puede dividir en dos respuestas específicas: (i) las neuronas que degeneran en el cerebelo de los pacientes de SCA, (ii) en células gliales del cerebelo de los pacientes SCA.
3. El sistema endocannabinoide se ve alterado durante la progresión de la SCA3 en los ratones transgénicos CMVMJD135. Los cambios observados aparecen en las *N*-aciletanolaminas AEA y OEA, y sobre todo, en el receptor CB₁ y la enzima FAAH, unos cambios que se presentan de forma diferencial dependiendo de la estructura del cerebro y la etapa de la enfermedad analizada.
4. Los cambios tempranos observados en el sistema endocannabinoide en el cerebro de los ratones SCA3 aparecen en la enzima FAAH en cerebelo, tronco cerebral y a nivel de las etapas tempranas de la enfermedad. En el tronco cerebral, el incremento de la enzima FAAH se acopla a una disminución en las *N*-aciletanolaminas AEA y OEA.
5. Los cambios tardíos observados en el sistema endocannabinoide en el cerebro de los ratones SCA3 afectan al receptor CB₁, el cual aparece incrementado en el cerebelo. En el estriado, en las etapas avanzadas de la enfermedad, se observa por el contrario un descenso de inmunorreactividad para el receptor CB₁. En esta estructura (el estriado) y a esta edad se observa en cambio un aumento en los niveles de la enzima FAAH.
6. Los receptores cannabinoides CB₁ forman heterómeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} en el cerebro de los ratones *wildtype*.
7. La formación de heterómeros CB₁-CB₂ y CB₁-A_{2A} disminuyen de manera drástica en el cerebro de ratones SCA3 en las etapas avanzadas de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abadji, V., Lin, S., Taha, G., Griffin, G., Stevenson, L.A., Pertwee, R.G., and Makriyannis, A. (1994). (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J. Med. Chem.* 37, 1889–1893.
- Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 19, 1704–1706.
- Aguado, T., Palazuelos, J., Monory, K., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2006). The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 26, 1551–1561.
- Aguado, T., Romero, E., Monory, K., Palazuelos, J., Sendtner, M., Marsicano, G., Lutz, B., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2007). The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23892–23898.
- Ahern, G.P. (2003). Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J. Biol. Chem.* 278, 30429–30434.
- Alger, B.E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog. Neurobiol.* 68, 247–286.
- Allan, S.M., and Rothwell, N.J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 734–744.
- Alves, S., Régulier, E., Nascimento-Ferreira, I., Hassig, R., Dufour, N., Koeppen, A., Carvalho, A.L., Simões, S., de Lima, M.C.P., Brouillet, E., et al. (2008). Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2071–2083.
- Ameri, A., Wilhelm, A., and Simmet, T. (1999). Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1831–1839.
- Andersson, M., Usiello, A., Borgkvist, A., Pozzi, L., Dominguez, C., Fienberg, A.A., Svenningsson, P., Fredholm, B.B., Borrelli, E., Greengard, P., et al. (2005). Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J. Neurosci.* 25, 8432–8438.
- Angelis, M.H. de, Chambon, P., and Brown, S. (2009). *Standards of Mouse Model Phenotyping* (John Wiley & Sons).
- Araujo, J., Breuer, P., Dieringer, S., Krauss, S., Dorn, S., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Klockgether, T., Wuellner, U., and Evert, B.O. (2011). FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2928–2941.
- Arevalo-Martin, A., Garcia-Ovejero, D., and Molina-Holgado, E. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol reduces lesion expansion and white matter damage after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* 38, 304–312.
- Ashton, J.C., and Glass, M. (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr Neuroparmacol* 5, 73–80.
- Ashton, J.C., Appleton, I., Darlington, C.L., and Smith, P.F. (2004). Immunohistochemical localization of cannabinoid CB1 receptor in inhibitory interneurons in the cerebellum. *Cerebellum* 3, 222–226.
- Ashton, J.C., Friberg, D., Darlington, C.L., and Smith, P.F. (2006). Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396, 113–116.

Atwood, B.K., and Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 467–479.

B

Baker, D., and Pryce, G. (2003). The therapeutic potential of cannabis in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* *12*, 561–567.

Balderas, A., Guillem, A.M., Martínez-Lozada, Z., Hernández-Kelly, L.C., Aguilera, J., and Ortega, A. (2014). GLAST/EAAT1 regulation in cultured Bergmann glia cells: Role of the NO/cGMP signaling pathway. *Neurochemistry International* *73*, 139–145.

Balenga, N.A.B., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A.J., Heinemann, A., and Waldhoer, M. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* *21*, 1452–1469.

Battista, N., Bari, M., Tarditi, A., Mariotti, C., Bachoud-Lévi, A.-C., Zuccato, C., Finazzi-Agrò, A., Genitrini, S., Peschanski, M., Di Donato, S., et al. (2007). Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol. Dis.* *27*, 108–116.

Begg, M., Pacher, P., Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F.M., Liu, J., and Kunos, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol. Ther.* *106*, 133–145.

Beltramo, M., and Piomelli, D. (2000). Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport* *11*, 1231–1235.

Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., and Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* *277*, 1094–1097.

Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., et al. (2012a). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* *15*, 558–564.

Benito, C., Núñez, E., Tolón, R.M., Carrier, E.J., Rábano, A., Hillard, C.J., and Romero, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J. Neurosci.* *23*, 11136–11141.

Benito, C., Kim, W.-K., Kim, W.-K., Chavarría, I., Hillard, C.J., Mackie, K., Tolón, R.M., Williams, K., Williams, K., and Romero, J. (2005). A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis. *J. Neurosci.* *25*, 2530–2536.

Benito, C., Romero, J.P., Tolón, R.M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C.J., Guaza, C., and Romero, J. (2007). Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J. Neurosci.* *27*, 2396–2402.

Benito, C., Tolón, R.M., Pazos, M.R., Núñez, E., Castillo, A.I., and Romero, J. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 277–285.

Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yoshimasa, T., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1985). Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* *260*, 7094–7101.

Bergamaschi, M.M., Queiroz, R.H.C., Zuardi, A.W., and Crippa, J.A.S. (2011). Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr Drug Saf* *6*, 237–249.

Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A.L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M.J., Milman, G., et al. (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 51, 476–487.

Berrendero, F., Castañé, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2003). Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 315–324.

Bettencourt, C., and Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 6.

Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Valverde, O., Otto, M., Michel, K., Sarstre, M., and Zimmer, A. (2005a). Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15670–15675.

Bilsland, L.G., Dick, J.R.T., Pryce, G., Petrosino, S., Marzo, V.D., Baker, D., and Greensmith, L. (2006). Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J* 20, 1003–1005.

Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., and Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256, 377–380.

Bisogno, T., Melck, D., Bobrov MYu, null, Gretskeya, N.M., Bezuglov, V.V., De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (2000). N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 351 Pt 3, 817–824.

Bisogno, T., MacCarrone, M., De Petrocellis, L., Jarrahian, A., Finazzi-Agrò, A., Hillard, C., and Di Marzo, V. (2001). The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur. J. Biochem.* 268, 1982–1989.

Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.-J., et al. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* 163, 463–468.

Bisogno, T., Ligresti, A., and Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 224–238.

Bisogno, T., Martire, A., Petrosino, S., Popoli, P., and Di Marzo, V. (2008). Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 52, 307–313.

Blankman, J.L., and Cravatt, B.F. (2013). Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. *Pharmacol Rev* 65, 849–871.

Blázquez, C., Chiarlone, A., Sagredo, O., Aguado, T., Pazos, M.R., Resel, E., Palazuelos, J., Julien, B., Salazar, M., Börner, C., et al. (2011). Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain* 134, 119–136.

Bloom AS, Risinger RC, Ross TJ, and Stein EA (2000). Effects of delta9 tetrahydrocannabinol (THC) on brain activity and cognitive task-induced brain activation: A fMRI study. *NIDA Res Monogr* 180.

Bonaventura, J., Rico, A.J., Moreno, E., Sierra, S., Sánchez, M., Luquin, N., Farré, D., Müller, C.E., Martínez-Pinilla, E., Cortés, A., et al. (2014). L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology* 79, 90–100.

- Bordey, A., and Sontheimer, H. (2003). Modulation of glutamatergic transmission by bergmann glial cells in rat cerebellum in situ. *J. Neurophysiol.* 89, 979–988.
- Borges, R.S., Batista, J., Viana, R.B., Baetas, A.C., Orestes, E., Andrade, M.A., Honório, K.M., and da Silva, A.B.F. (2013). Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants. *Molecules* 18, 12663–12674.
- Bosier, B., Bellocchio, L., Metna-Laurent, M., Soria-Gomez, E., Matias, I., Hebert-Chatelain, E., Cannich, A., Maitre, M., Leste-Lasserre, T., Cardinal, P., et al. (2013). Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Molecular Metabolism* 2, 393–404.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrié, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995a). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* 312 (Pt 2), 637–641.
- Bouaboula, M., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995c). Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13973–13980.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Marchand, J., Canat, X., Bourrié, B., Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Le Fur, G., and Casellas, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur. J. Biochem.* 237, 704–711.
- Bouchard, J.-F., Lépicier, P., and Lamontagne, D. (2003). Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* 72, 1859–1870.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127.
- Breivogel, C.S., Walker, J.M., Huang, S.M., Roy, M.B., and Childers, S.R. (2004). Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. *Neuropharmacology* 47, 81–91.
- Bruni, A.C., Takahashi-Fujigasaki, J., Maltecca, F., Foncin, J.F., Servadio, A., Casari, G., D'Adamo, P., Maletta, R., Curcio, S.A.M., De Michele, G., et al. (2004). Behavioral disorder, dementia, ataxia, and rigidity in a large family with TATA box-binding protein mutation. *Arch. Neurol.* 61, 1314–1320.
- Brusco, A., Tagliaferro, P.A., Saez, T., and Onaivi, E.S. (2008). Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1139, 450–457.
- Burrigh, E.N., Clark, H.B., Servadio, A., Matilla, T., Feddersen, R.M., Yunis, W.S., Duvick, L.A., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (1995). SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell* 82, 937–948.
- Burstein, S. (1991). Cannabinoid induced changes in eicosanoid synthesis by mouse peritoneal cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 288, 107–112.
- Burstein, S., Budrow, J., Debatis, M., Hunter, S.A., and Subramanian, A. (1994). Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1253–1264.
- Burston, J.J., Wiley, J.L., Craig, A.A., Selley, D.E., and Sim-Selley, L.J. (2010). Regional enhancement of cannabinoid CB₁ receptor desensitization in female adolescent rats following repeated Delta-tetrahydrocannabinol exposure. *Br. J. Pharmacol.* 161, 103–112.
- Butovsky, E., Juknat, A., Goncharov, I., Elbaz, J., Eilam, R., Zangen, A., and Vogel, Z. (2005). In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol. *J. Neurochem.* 93, 802–811.

C

- Cabral, G.A., and Staab, A. (2005). Effects on the immune system. *Handb Exp Pharmacol* 385–423.
- Cabral, G.A., Harmon, K.N., and Carlisle, S.J. (2001). Cannabinoid-mediated inhibition of inducible nitric oxide production by rat microglial cells: evidence for CB1 receptor participation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 493, 207–214.
- Cadogan, A.K., Alexander, S.P., Boyd, E.A., and Kendall, D.A. (1997). Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J. Neurochem.* 69, 1131–1137.
- Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., Mallol, J., Casadó, V., Lanciego, J.L., Franco, R., Lluís, C., et al. (2012a). Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J. Biol. Chem.* 287, 20851–20865.
- Capasso, R., Izzo, A.A., Fezza, F., Pinto, A., Capasso, F., Mascolo, N., and Di Marzo, V. (2001). Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br. J. Pharmacol.* 134, 945–950.
- Carey, M.R., Myoga, M.H., McDaniels, K.R., Marsicano, G., Lutz, B., Mackie, K., and Regehr, W.G. (2011). Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses. *J. Neurophysiol.* 105, 958–963.
- Carlson, K.M., Andresen, J.M., and Orr, H.T. (2009). Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 247–253.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32, 2249–2259.
- Cassol-Jr, O.J., Comim, C.M., Silva, B.R., Hermani, F.V., Constantino, L.S., Felisberto, F., Petronilho, F., Hallak, J.E.C., De Martinis, B.S., Zuardi, A.W., et al. (2010). Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Research* 1348, 128–138.
- Castejón, O.J., Dailey, M.E., Apkarian, R.P., and Castejón, H.V. (2002). Correlative microscopy of cerebellar Bergmann glial cells. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 34, 131–142.
- Castillo, A., Tolón, M.R., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., and Martinez-Orgado, J. (2010a). The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol. Dis.* 37, 434–440.
- Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E., and Hashimoto-dani, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76, 70–81.
- Caterina, M.J., and Julius, D. (2001). The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487–517.
- Cemal, C.K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H.M., Pook, M.A., Huxley, C., and Chamberlain, S. (2002). YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1075–1094.
- Center for History and New Media Guía rápida.
- Chanda, P.K., Gao, Y., Mark, L., Btesh, J., Strassle, B.W., Lu, P., Piesla, M.J., Zhang, M.-Y., Bingham, B., Uveges, A., et al. (2010). Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol. Pharmacol.* 78, 996–1003.

- Chen, J.-Z., Han, X.-W., and Xie, X.-Q. (2005). Preferred conformations of endogenous cannabinoid ligand anandamide. *Life Sci.* 76, 2053–2069.
- Chevalere, V., and Castillo, P.E. (2004). Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43, 871–881.
- Chevalere, V., Takahashi, K.A., and Castillo, P.E. (2006). Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 37–76.
- Chou, A.-H., Yeh, T.-H., Kuo, Y.-L., Kao, Y.-C., Jou, M.-J., Hsu, C.-Y., Tsai, S.-R., Kakizuka, A., and Wang, H.-L. (2006a). Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL. *Neurobiol. Dis.* 21, 333–345.
- Chou, A.-H., Yeh, T.-H., Ouyang, P., Chen, Y.-L., Chen, S.-Y., and Wang, H.-L. (2008). Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol. Dis.* 31, 89–101.
- Chou, A.-H., Lin, A.-C., Hong, K.-Y., Hu, S.-H., Chen, Y.-L., Chen, J.-Y., and Wang, H.-L. (2011). p53 activation mediates polyglutamine-expanded ataxin-3 upregulation of Bax expression in cerebellar and pontine nuclei neurons. *Neurochem. Int.* 58, 145–152.
- Citraro, R., Russo, E., Scicchitano, F., van Rijn, C.M., Cosco, D., Avagliano, C., Russo, R., D'Agostino, G., Petrosino, S., Guida, F., et al. (2013). Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 69, 115–126.
- Clarke, W.P. (2005). What's for lunch at the conformational cafeteria? *Mol. Pharmacol.* 67, 1819–1821.
- Cohen-Yeshurun, A., Trembovler, V., Alexandrovich, A., Ryberg, E., Greasley, P.J., Mechoulam, R., Shohami, E., and Leker, R.R. (2011). N-arachidonoyl-L-serine is neuroprotective after traumatic brain injury by reducing apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1768–1777.
- Compagnucci, C., Di Siena, S., Bustamante, M.B., Di Giacomo, D., Di Tommaso, M., Maccarrone, M., Grimaldi, P., and Sette, C. (2013). Type-1 (CB1) Cannabinoid Receptor Promotes Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Stem Cells. *PLoS ONE* 8.
- Compton, D.R., Gold, L.H., Ward, S.J., Balster, R.L., and Martin, B.R. (1992). Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 1118–1126.
- Connor, B., and Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 27, 1–39.
- Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., and Giagnoni, G. (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 135, 181–187.
- Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2005). The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem* 5, 671–675.
- Correa, F., Docagne, F., Mestre, L., Loria, F., Hernangómez, M., Borrell, J., and Guaza, C. (2007). Cannabinoid system and neuroinflammation: implications for multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 14, 182–187.
- Craig, K., Keers, S.M., Archibald, K., Curtis, A., and Chinnery, P.F. (2004). Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxia type 6. *Ann Neurol.* 55, 752–755.

Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2004). The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J. Neurobiol.* *61*, 149–160.

Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., and Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* *384*, 83–87.

Crawley, J.N., Corwin, R.L., Robinson, J.K., Felder, C.C., Devane, W.A., and Axelrod, J. (1993). Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *46*, 967–972.

Cristiano, L., Bernardo, A., and Cerù, M.P. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J. Neurocytol.* *30*, 671–683.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., and Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* *139*, 1405–1415.

Cui, W., Allen, N.D., Skynner, M., Gusterson, B., and Clark, A.J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* *34*, 272–282.

Cullingford, T.E., Bhakoo, K., Peuchen, S., Dolphin, C.T., Patel, R., and Clark, J.B. (1998). Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J. Neurochem.* *70*, 1366–1375.

Custer, S.K., Garden, G.A., Gill, N., Rueb, U., Libby, R.T., Schultz, C., Guyenet, S.J., Deller, T., Westrum, L.E., Sopher, B.L., et al. (2006). Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat. Neurosci.* *9*, 1302–1311.

Cutando, L., Busquets-Garcia, A., Puighermanal, E., Gomis-González, M., Delgado-García, J.M., Gruart, A., Maldonado, R., and Ozaita, A. (2013). Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure. *Journal of Clinical Investigation* *123*, 2816–2831.

Cvetanovic, M. (2015). Decreased Expression of Glutamate Transporter GLAST in Bergmann Glia Is Associated with the Loss of Purkinje Neurons in the Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Cerebellum* *14*, 8–11.

D

D’Addario, C., Di Francesco, A., Arosio, B., Gussago, C., Dell’Osso, B., Bari, M., Galimberti, D., Scarpini, E., Altamura, A.C., Mari, D., et al. (2012). Epigenetic regulation of fatty acid amide hydrolase in Alzheimer disease. *PLoS ONE* *7*.

Dainese, E., Oddi, S., Bari, M., and Maccarrone, M. (2007a). Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr. Med. Chem.* *14*, 2702–2715.

D’Ambra, T.E., Estep, K.G., Bell, M.R., Eissenstat, M.A., Josef, K.A., Ward, S.J., Haycock, D.A., Baizman, E.R., Casiano, F.M., and Beglin, N.C. (1992). Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* *35*, 124–135.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* *65*, 1–105.

Daniel, P.H., and Crepel, D.F. (2013). Purkinje Neurons: Synaptic Plasticity. In *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, M. Manto, J.D. Schmahmann, F. Rossi, D.L. Gruol, and N. Koibuchi, eds. (Springer Netherlands), pp. 793–808.

Dar, M.S. (2000). Cerebellar CB(1) receptor mediation of Delta(9)-THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A(1) receptor in the mouse. *Brain Res.* 864, 186-194.

Davis, M.I., Ronesi, J., and Lovinger, D.M. (2003). A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 278, 48973-48980.

Davis, W.M., Moreton, J.E., King, W.T., and Pace, H.B. (1972). Marijuana on locomotor activity: biphasic effect and tolerance development. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 3, 29-35.

Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Bennett, B.A., Edwards, T.A., Mu, J., Pacheco, M.A., Ward, S.J., and Childers, S.R. (1993). Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Recept. Channels* 1, 121-134.

Demuth, D.G., and Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci.* 78, 549-563.

Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J.C., de Franciscis, V., Gelman, M., and Girault, J.A. (1996). Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* 273, 1719-1722.

Derkinderen, P., Valjent, E., Toutant, M., Corvol, J.-C., Enslen, H., Ledent, C., Trzaskos, J., Caboche, J., and Girault, J.-A. (2003). Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 2371-2382.

DeSanty, K.P., and Dar, M.S. (2001a). Cannabinoid-induced motor incoordination through the cerebellar CB(1) receptor in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69, 251-259.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 34, 605-613.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949.

Dewey, W.L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 38, 151-178.

Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 135-161.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10819-10824.

Docagne, F., Muñetón, V., Clemente, D., Ali, C., Loría, F., Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Vivien, D., and Guaza, C. (2007). Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 551-561.

Döhlinger, S., Hauser, T.-K., Borkert, J., Luft, A.R., and Schulz, J.B. (2008). Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 7, 204-214.

Dong, X., Wang, Y., and Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 30, 379-387.

Dowie, M.J., Bradshaw, H.B., Howard, M.L., Nicholson, L.F.B., Faull, R.L.M., Hannan, A.J., and Glass, M. (2009). Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* 163, 456-465.

Dowie, M.J., Scotter, E.L., Molinari, E., and Glass, M. (2010). The therapeutic potential of G-protein coupled receptors in Huntington's disease. *Pharmacol. Ther.* 128, 305–323.

Drechsel, D.A., Estévez, A.G., Barbeito, L., and Beckman, J.S. (2012). Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. *Neurotox Res* 22, 251–264.

Duarte-Silva, S., Neves-Carvalho, A., Soares-Cunha, C., Teixeira-Castro, A., Oliveira, P., Silva-Fernandes, A., and Maciel, P. (2014). Lithium chloride therapy fails to improve motor function in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease. *Cerebellum* 13, 713–727.

Dueñas, A.M., Goold, R., and Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129, 1357–1370.

Durr, A. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *The Lancet Neurology* 9, 885–894.

Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., et al. (1996). Spinocerebellar ataxia 3 and machado-joseph disease: Clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol.* 39, 490–499.

Dziadulewicz, E.K., Bevan, S.J., Brain, C.T., Coote, P.R., Culshaw, A.J., Davis, A.J., Edwards, L.J., Fisher, A.J., Fox, A.J., Gentry, C., et al. (2007). Naphthalen-1-yl-(4-pentyloxynaphthalen-1-yl)methanone: a potent, orally bioavailable human CB1/CB2 dual agonist with antihyperalgesic properties and restricted central nervous system penetration. *J. Med. Chem.* 50, 3851–3856.

E

Ebadi, M., Bashir, R.M., Heidrick, M.L., Hamada, F.M., Refaey, H.E., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M.D., Cerutis, D.R., and Lassi, N.K. (1997). Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.* 30, 347–374.

Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15–36.

Egertová, M., and Elphick, M.R. (2000). Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.

Egertová, M., Giang, D.K., Cravatt, B.F., and Elphick, M.R. (1998). A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc. Biol. Sci.* 265, 2081–2085.

Egertová, M., Cravatt, B.F., and Elphick, M.R. (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119, 481–496.

Eggan, S.M., and Lewis, D.A. (2007). Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: a regional and laminar analysis. *Cereb. Cortex* 17, 175–191.

Elsohly, M.A., and Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 78, 539–548.

Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., Pertwee, R.G., Mechoulam, R., and García, C. (2013). Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 75, 155–163.

Espejo-Porras, F., Piscitelli, F., Verde, R., Ramos, J.A., Di Marzo, V., de Lago, E., and Fernández-Ruiz, J. (2015). Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43

transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.*

Esposito, G., De Filippis, D., Maiuri, M.C., De Stefano, D., Carnuccio, R., and Iuvone, T. (2006). Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci. Lett.* 399, 91-95.

Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., and Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* 151, 1272-1279.

Esposito, G., Scuderi, C., Valenza, M., Togna, G.I., Latina, V., De Filippis, D., Cipriano, M., Carratù, M.R., Iuvone, T., and Steardo, L. (2011). Cannabidiol reduces Aβ-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARγ involvement. *PLoS ONE* 6.

Evans, F.J. (1997). The Medicinal Chemistry of Cannabis: O'Shaughnessy's Legacy. *Pharmacy and Pharmacology Communications* 3, 533-537.

Evert, B.O., Vogt, I.R., Kindermann, C., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Schmitt, I., Klockgether, T., and Wüllner, U. (2001). Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J. Neurosci.* 21, 5389-5396.

Evert, B.O., Vogt, I.R., Vieira-Saecker, A.M., Ozimek, L., de Vos, R.A.I., Brunt, E.R.P., Klockgether, T., and Wüllner, U. (2003). Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 1006-1018.

Evert, B.O., Schelhaas, J., Fleischer, H., de Vos, R. a. I., Brunt, E.R., Stenzel, W., Klockgether, T., and Wüllner, U. (2006). Neuronal intranuclear inclusions, dysregulation of cytokine expression and cell death in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin. Neuropathol.* 25, 272-281.

F

Fagan, S.G., and Campbell, V.A. (2014). The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1347-1360.

Farooqui, A.A., Liss, L., and Horrocks, L.A. (1988). Stimulation of lipolytic enzymes in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 23, 306-308.

Felder, C.C., and Glass, M. (1998). Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 179-200.

Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., and Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.* 48, 443-450.

Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., et al. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393, 231-235.

Fernández-Ruiz, J. (2009). The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1029-1040.

Fernández-Ruiz, J., and González, S. (2005). Cannabinoid Control of Motor Function at the Basal Ganglia. In *Cannabinoids*, P.D.R.G. Pertwee, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 479-507.

Fernández-Ruiz, J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S., and Ramos, J.A. (2002). Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 257-267.

Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R.M., Ramos, J.A., and Guzmán, M. (2007a). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 39-45.

Fernández-Ruiz, J., Pazos, M.R., García-Arencibia, M., Sagredo, O., and Ramos, J.A. (2008). Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, S91-S96.

Fernández-Ruiz, J., García, C., Sagredo, O., Gómez-Ruiz, M., and de Lago, E. (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 387-404.

Fernández-Ruiz, J., Moreno-Martet, M., Rodríguez-Cueto, C., Palomo-Garo, C., Gómez-Cañas, M., Valdeolivas, S., Guaza, C., Romero, J., Guzmán, M., Mechoulam, R., et al. (2011). Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1365-1378.

Fernández-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M.R., García, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., and Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br J Clin Pharmacol* 75, 323-333.

Fernández-Ruiz, J., de Lago, E., Gómez-Ruiz, M., García, C., Sagredo, O., and García-Arencibia, M. (2014a). Neurodegenerative Disorders Other Than Multiple Sclerosis. In *Handbook of Cannabis*, R. Pertwee, ed. (Oxford University Press), pp. 505-525.

Ferré, P. (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53 Suppl 1, S43-S50.

Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S.R., Javitch, J.A., Lohse, M.J., et al. (2009). Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* 5, 131-134.

Fezza, F., Bisogno, T., Minassi, A., Appendino, G., Mechoulam, R., and Di Marzo, V. (2002). Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.* 513, 294-298.

De Filippis, D., Steardo, A., D'Amico, A., Scuderi, C., Cipriano, M., Esposito, G., and Iuvone, T. (2009). Differential cannabinoid receptor expression during reactive gliosis: a possible implication for a nonpsychotropic neuroprotection. *ScientificWorldJournal* 9, 229-235.

Fimiani, C., Liberty, T., Aquirre, A.J., Amin, I., Ali, N., and Stefano, G.B. (1999). Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 57, 23-34.

Fouda, H.G., Lukaszewicz, J., and Luther, E.W. (1987). Selected ion monitoring analysis of CP-55,940, a cannabinoid derived analgetic agent. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14, 599-602.

Fowler, C.J. (2003). Plant-derived, synthetic and endogenous cannabinoids as neuroprotective agents. Non-psychoactive cannabinoids, "entourage" compounds and inhibitors of N-acyl ethanolamine breakdown as therapeutic strategies to avoid psychotropic effects. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 41, 26-43.

Fowler, C.J. (2004). Oleamide: a member of the endocannabinoid family? *Br J Pharmacol* 141, 195-196.

Fowler, C.J. (2007). The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *Br J Pharmacol* 152, 594-601.

Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

Fride, E., and Mechoulam, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 313–314.

Friedman, M.J., Shah, A.G., Fang, Z.-H., Ward, E.G., Warren, S.T., Li, S., and Li, X.-J. (2007). Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 10, 1519–1528.

Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez De Fonseca, F., Rosengarth, A., Luecke, H., Di Giacomo, B., Tarzia, G., et al. (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* 425, 90–93.

Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., et al. (2012a). A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 64–69.

Fujigasaki, H., Martin, J.-J., Deyn, P.P.D., Camuzat, A., Deffond, D., Stevanin, G., Dermaut, B., Broeckhoven, C.V., Dürr, A., and Brice, A. (2001). CAG repeat expansion in the TATA box-binding protein gene causes autosomal dominant cerebellar ataxia. *Brain* 124, 1939–1947.

Fujita, M., Hiroko, S., Kuriyama, E., and Shigehiro, M. (1967). Studies on Cannabis. II. Examination of the narcotic and its related components in hems, crude drugs, and plant organs by gas-liquid chromatography and thin-layer chromatography. *Annu. Rep. Tokyo Coll. Pharm.* 17, 238–242.

Fusco, F.R., Martorana, A., Giampà, C., De March, Z., Farini, D., D'Angelo, V., Sancesario, G., and Bernardi, G. (2004). Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53, 159–167.

G

Galan-Rodriguez, B., Suarez, J., Gonzalez-Aparicio, R., Bermudez-Silva, F.J., Maldonado, R., Robledo, P., Rodriguez de Fonseca, F., and Fernandez-Espejo, E. (2009). Oleoylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 56, 653–664.

Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995a). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61.

Gallant, M., Dufresne, C., Gareau, Y., Guay, D., Leblanc, Y., Prasit, P., Rochette, C., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Tremblay, N., et al. (1996). New class of potent ligands for the human peripheral cannabinoid receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6, 2263–2268.

Galve-Roperh, I., Aguado, T., Palazuelos, J., and Guzmán, M. (2008). Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2279–2288.

Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646–1647.

García, C., Palomo-Garo, C., García-Arencibia, M., Ramos, J., Pertwee, R., and Fernández-Ruiz, J. (2011). Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1495–1506.

García, M.C., Cquina, V., Palomo-Garo, C., Rábano, A., and Fernández-Ruiz, J. (2015a). Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 587, 1–4.

García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J.A., Mechoulam, R., and Fernández-Ruiz, J. (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* 1134, 162–170.

García-Arencibia, M., García, C., and Fernández-Ruiz, J. (2009). Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 432–439.

García-Arencibia, M., Hochfeld, W.E., Toh, P.P.C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21, 691–698.

García-García, L., Delgado, M., Al-Sayed, A.A., Bascuñana, P., Fernández de la Rosa, R., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., and Pozo, M.A. (2014). In Vivo [(18)F] FDG PET Imaging Reveals that p-Chloroamphetamine Neurotoxicity is Associated with Long-Term Cortical and Hippocampal Hypometabolism. *Mol Imaging Biol.*

Garcia-Ovejero, D., Arevalo-Martin, A., Petrosino, S., Docagne, F., Hagen, C., Bisogno, T., Watanabe, M., Guaza, C., Di Marzo, V., and Molina-Holgado, E. (2009a). The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol. Dis.* 33, 57–71.

Gatchel, J.R., and Zoghbi, H.Y. (2005). Diseases of Unstable Repeat Expansion: Mechanisms and Common Principles. *Nat Rev Genet* 6, 743–755.

George, S.R., O'Dowd, B.F., and Lee, S.P. (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1, 808–820.

Giacoppo, S., Mandolino, G., Galuppo, M., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2014). Cannabinoids: new promising agents in the treatment of neurological diseases. *Molecules* 19, 18781–18816.

Gifford, A.N., Bruneus, M., Lin, S., Goutopoulos, A., Makriyannis, A., Volkow, N.D., and Gatley, S.J. (1999). Potentiation of the action of anandamide on hippocampal slices by the fatty acid amide hydrolase inhibitor, palmitylsulphonyl fluoride (AM 374). *Eur. J. Pharmacol.* 383, 9–14.

Gilbert, G.L., Kim, H.J., Waataja, J.J., and Thayer, S.A. (2007). Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Res.* 1128, 61–69.

Glaser, S.T., Abumrad, N.A., Fatade, F., Kaczocha, M., Studholme, K.M., and Deutsch, D.G. (2003). Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4269–4274.

Glass, M. (2001). The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25, 743–765.

Glass, M., and Felder, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.* 17, 5327–5333.

Glass, M., and Northup, J.K. (1999). Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol. Pharmacol.* 56, 1362–1369.

Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.

Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J.A., and Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 105–111.

Golech, S.A., McCarron, R.M., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., Shohami, E., and Spatz, M. (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 132, 87–92.

- Gomez, O., Sanchez-Rodriguez, A., Le, M., Sanchez-Caro, C., Molina-Holgado, F., and Molina-Holgado, E. (2011a). Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 1520–1532.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., and Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem. J.* *347*, 369–373.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., and Guzmán, M. (2002). De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* *363*, 183–188.
- Gómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernández-Ruiz, J., and García, C. (2015). Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*.
- Gong, J.-P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.-R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., and Uhl, G.R. (2006a). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* *1071*, 10–23.
- Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., and Hipkin, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.* *57*, 1045–1050.
- Gonzalez-Aparicio, R., Blanco, E., Serrano, A., Pavon, F.J., Parsons, L.H., Maldonado, R., Robledo, P., Fernandez-Espejo, E., and Fonseca, F.R. de (2014). The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *International Journal of Neuropsychopharmacology* *17*, 455–468.
- Goparaju, S.K., Ueda, N., Yamaguchi, H., and Yamamoto, S. (1998). Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett.* *422*, 69–73.
- Gould C, V.F. (2012). Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (Machado-Joseph Disease). *Neurotherapeutics* *9*, 285–296.
- Gowran, A., Noonan, J., and Campbell, V.A. (2011). The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration. *CNS Neurosci Ther* *17*, 637–644.
- Greenfield JG (1954). The spino-cerebellar degenerations. Springfield: Charles C Thom as.
- Griffin, G., Wray, E.J., Tao, Q., McAllister, S.D., Rorrer, W.K., Aung, M.M., Martin, B.R., and Abood, M.E. (1999). Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* *377*, 117–125.
- Gudermann, T., Schöneberg, T., and Schultz, G. (1997). Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* *20*, 399–427.
- Guindon, J., and Hohmann, A.G. (2008). A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 1341–1343.
- Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boschia, F., and Freund, T.F. (2004a). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 441–458.
- Guo, J., Williams, D.J., and Ikeda, S.R. (2008). N-arachidonoyl L-serine, a putative endocannabinoid, alters the activation of N-type Ca²⁺ channels in sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* *100*, 1147–1151.

Guyenet, S.J., Furrer, S.A., Damian, V.M., Baughan, T.D., La Spada, A.R., and Garden, G.A. (2010). A Simple Composite Phenotype Scoring System for Evaluating Mouse Models of Cerebellar Ataxia. *J Vis Exp*.

Guzmán, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blázquez, C., and Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J. Biol. Chem.* 279, 27849–27854.

H

Hampson, A.J., and Grimaldi, M. (2001). Cannabinoid receptor activation and elevated cyclic AMP reduce glutamate neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1529–1536.

Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., and Wink, D. (1998a). Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 8268–8273.

Hampson, A.J., Bornheim, L.M., Scanziani, M., Yost, C.S., Gray, A.T., Hansen, B.M., Leonoudakis, D.J., and Bickler, P.E. (1998c). Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* 70, 671–676.

Hansen, H.S., Moesgaard, B., Petersen, G., and Hansen, H.H. (2002). Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol. Ther.* 95, 119–126.

Hansen, K.B., Rosenkilde, M.M., Knop, F.K., Wellner, N., Diep, T.A., Rehfeld, J.F., Andersen, U.B., Holst, J.J., and Hansen, H.S. (2011a). 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1409–E1417.

Hanson, J.R. (2007). Diterpenoids. *Nat Prod Rep* 24, 1332–1341.

Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I., and Mechoulam, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3662–3665.

Harding, A.E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1, 1151–1155.

Harding, A.E. (1993). Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol* 61, 1–14.

Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2007). Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* 13, 127–137.

He, J.C., Gomes, I., Nguyen, T., Jayaram, G., Ram, P.T., Devi, L.A., and Iyengar, R. (2005a). The G α (o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J. Biol. Chem.* 280, 33426–33434.

Henstridge, C.M., Balenga, N.A.B., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., and Irving, A.J. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J.* 23, 183–193.

Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Schröder, R., Kargl, J.K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J.L., Kostenis, E., et al. (2010). GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 160, 604–614.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991a). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583.

Herkenham, M., Groen, B.G., Lynn, A.B., De Costa, B.R., and Richfield, E.K. (1991b). Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain Res.* 552, 301–310.

Herrera, B., Carracedo, A., Diez-Zaera, M., Guzmán, M., and Velasco, G. (2005). p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Lett.* 579, 5084–5088.

Herring, A.C., Koh, W.S., and Kaminski, N.E. (1998). Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and kappaB elements by cannabinal, a minimally CNS-active cannabinoid. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1013–1023.

Hillard, C.J., Edgemond, W.S., Jarrahian, A., and Campbell, W.B. (1997). Accumulation of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* 69, 631–638.

Hillard, C.J., Manna, S., Greenberg, M.J., DiCamelli, R., Ross, R.A., Stevenson, L.A., Murphy, V., Pertwee, R.G., and Campbell, W.B. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 1427–1433.

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241–251.

Hoehe, M.R., Caenazzo, L., Martinez, M.M., Hsieh, W.T., Modi, W.S., Gershon, E.S., and Bonner, T.I. (1991). Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol.* 3, 880–885.

Hoffman, A.F., Riegel, A.C., and Lupica, C.R. (2003a). Functional localization of cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid production in distinct neuron populations of the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 18, 524–534.

Hoffman, A.F., Oz, M., Caulder, T., and Lupica, C.R. (2003b). Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure. *J. Neurosci.* 23, 4815–4820.

Hourez, R., Servais, L., Orduz, D., Gall, D., Millard, I., de Kerchove d'Exaerde, A., Cheron, G., Orr, H.T., Pandolfo, M., and Schiffmann, S.N. (2011). Aminopyridines correct early dysfunction and delay neurodegeneration in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *J. Neurosci.* 31, 11795–11807.

Howlett, A.C. (1985). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 27, 429–436.

Howlett, A.C., and Fleming, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol. Pharmacol.* 26, 532–538.

Howlett, A.C., and Mukhopadhyay, S. (2000). Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids* 108, 53–70.

Howlett, A.C., Qualy, J.M., and Khachatrian, L.L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol. Pharmacol.* 29, 307–313.

Howlett, A.C., Champion, T.M., Wilken, G.H., and Mechoulam, R. (1990). Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* 29, 161–165.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202.

Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., and Porrino, L.J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 345–358.

Hu, S.S.-J., Bradshaw, H.B., Chen, J.S.-C., Tan, B., and Walker, J.M. (2008). Prostaglandin E2 glycerol ester, an endogenous COX-2 metabolite of 2-arachidonoylglycerol, induces hyperalgesia and modulates NFkappaB activity. *Br. J. Pharmacol.* *153*, 1538–1549.

Huang, S.M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T.J., Krey, J.F., Chu, C.J., et al. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 8400–8405.

Hübener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driefen, S., et al. (2011d). N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain* *134*, 1925–1942.

Huffman, J.W., Padgett, L.W., Isherwood, M.L., Wiley, J.L., and Martin, B.R. (2006). 1-Alkyl-2-aryl-4-(1-naphthoyl)pyrroles: New high affinity ligands for the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *16*, 5432–5435.

Hunter, S.A., and Burstein, S.H. (1997). Receptor mediation in cannabinoid stimulated arachidonic acid mobilization and anandamide synthesis. *Life Sci.* *60*, 1563–1573.

I

Iacopino, A.M., and Christakos, S. (1990). Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 4078–4082.

Iannotti, F.A., Hill, C.L., Leo, A., Alhusaini, A., Soubrane, C., Mazzearella, E., Russo, E., Whalley, B.J., Di Marzo, V., and Stephens, G.J. (2014). Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem Neurosci* *5*, 1131–1141.

Ichise, T., Kano, M., Hashimoto, K., Yanagihara, D., Nakao, K., Shigemoto, R., Katsuki, M., and Aiba, A. (2000). mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* *288*, 1832–1835.

Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat. Genet.* *13*, 196–202.

Irving, A.J., Rae, M.G., and Coutts, A.A. (2002a). Cannabinoids on the brain. *ScientificWorldJournal* *2*, 632–648.

Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E., and Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* *118*, 2023–2028.

Ishikawa, K., Mizusawa, H., Fujita, T., Ohkoshi, N., Doi, M., Komatsuzaki, Y., Iwamoto, H., Ogata, T., and Shoji, S. (1995). Calbindin-D 28k immunoreactivity in the cerebellum of spinocerebellar degeneration. *J. Neurol. Sci.* *129*, 179–185.

Iuvone, T., Esposito, G., De Filippis, D., Scuderi, C., and Steardo, L. (2009). Cannabidiol: a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* *15*, 65–75.

Iwata, A., Christianson, J.C., Bucci, M., Ellerby, L.M., Nukina, N., Forno, L.S., and Kopito, R.R. (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 13135–13140.

J

Jackson, S.J., Diemel, L.T., Pryce, G., and Baker, D. (2005). Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J. Neurol. Sci.* 233, 21–25.

Jacobi, H., Reetz, K., du Montcel, S.T., Bauer, P., Mariotti, C., Nanetti, L., Rakowicz, M., Sulek, A., Durr, A., Charles, P., et al. (2013). Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data. *Lancet Neurol* 12, 650–658.

Jiang, L.H., Gamper, N., and Beech, D.J. (2011). Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets* 12, 724–736.

Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265.

Joyeux, M., Arnaud, C., Godin-Ribuot, D., Demenge, P., Lamontagne, D., and Ribuo, C. (2002). Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 55, 619–625.

Juknat, A., Pietr, M., Kozela, E., Rimmerman, N., Levy, R., Coppola, G., Geschwind, D., and Vogel, Z. (2012). Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.* 165, 2512–2528.

K

Kaczocha, M., Glaser, S.T., and Deutsch, D.G. (2009). Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 6375–6380.

Kaminski, N.E. (1998). Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J. Neuroimmunol.* 83, 124–132.

Kano, M. (2014). Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 90, 235–250.

Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89, 309–380.

Kaplan, B.L.F. (2013). The role of CB1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 137, 365–374.

Kaplan EL, M.P. (1958). Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53, 457–481.

Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M.G., Barak, L.S., and Abood, M.E. (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J. Biol. Chem.* 284, 29817–29827.

Karanian, D.A., Brown, Q.B., Makriyannis, A., Kosten, T.A., and Bahr, B.A. (2005). Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J. Neurosci.* 25, 7813–7820.

Kasumu, A., and Bezprozvanny, I. (2012). Deranged calcium signaling in Purkinje cells and pathogenesis in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) and other ataxias. *Cerebellum* 11, 630–639.

- Katona, I., Urbán, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.-M., Piomelli, D., Mackie, K., and Freund, T.F. (2006). Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* *26*, 5628–5637.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., and Akiguchi, I. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* *8*, 221–228.
- Kawamura, Y., Fukaya, M., Maejima, T., Yoshida, T., Miura, E., Watanabe, M., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2006a). The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. *J. Neurosci.* *26*, 2991–3001.
- Khaspekov, L.G., Brenz Verca, M.S., Frumkina, L.E., Hermann, H., Marsicano, G., and Lutz, B. (2004). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1691–1698.
- Kim, S.H., Won, S.J., Mao, X.O., Jin, K., and Greenberg, D.A. (2005). Involvement of protein kinase A in cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *313*, 88–94.
- Kim, S.H., Won, S.J., Mao, X.O., Jin, K., and Greenberg, D.A. (2006). Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol. Pharmacol.* *69*, 691–696.
- Kirkham, T.C., and Tucci, S.A. (2006). Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* *5*, 272–292.
- Klein, J. (2000). Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm* *107*, 1027–1063.
- Klein, T.W. (2005). Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 400–411.
- Klockgether, T., Skalej, M., Wedekind, D., Luft, A.R., Welte, D., Schulz, J.B., Abele, M., Bürk, K., Laccone, F., Brice, A., et al. (1998). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain* *121* (Pt 9), 1687–1693.
- Koeppen, A.H. (2005). The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* *4*, 62–73.
- Koeppen, A.H., Davis, A.N., and Morral, J.A. (2011). The cerebellar component of Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol.* *122*, 323–330.
- Koeppen, A.H., Ramirez, R.L., Bjork, S.T., Bauer, P., and Feustel, P.J. (2013). The reciprocal cerebellar circuitry in human hereditary ataxia. *Cerebellum* *12*, 493–503.
- Köfalvi, A., Rodrigues, R.J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E.S., Cunha, R.A., and Sperlágh, B. (2005). Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J. Neurosci.* *25*, 2874–2884.
- Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K., and Yasukawa, M. (2006). Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *347*, 827–832.
- Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., and Sugiura, T. (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.* *429*, 152–156.
- Konno, A., Shuvaev, A.N., Miyake, N., Miyake, K., Iizuka, A., Matsuura, S., Huda, F., Nakamura, K., Yanagi, S., Shimada, T., et al. (2014). Mutant ataxin-3 with an abnormally expanded polyglutamine

chain disrupts dendritic development and metabotropic glutamate receptor signaling in mouse cerebellar Purkinje cells. *Cerebellum* 13, 29–41.

Kozak, K.R., Rowlinson, S.W., and Marnett, L.J. (2000). Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 33744–33749.

Kozak, K.R., Gupta, R.A., Moody, J.S., Ji, C., Boeglin, W.E., DuBois, R.N., Brash, A.R., and Marnett, L.J. (2002a). 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J. Biol. Chem.* 277, 23278–23286.

Kozela, E., Lev, N., Kaushansky, N., Eilam, R., Rimmerman, N., Levy, R., Ben-Nun, A., Juknat, A., and Vogel, Z. (2011). Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1507–1519.

Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001). Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J. Neurosci.* 21.

Kreitzer, A.C., Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2002). Inhibition of Interneuron Firing Extends the Spread of Endocannabinoid Signaling in the Cerebellum. *Neuron* 34, 787–796.

Krejci (1970). Changes with maturation in amounts of biologically interesting substances of Cannabis. In *The Botany and Chemistry of Cannabis*, (Churchill, London.: Joyce, C.R.B. and S.H. Curry, eds.),.

Labar, G., and Michaux, C. (2007). Fatty acid amide hydrolase: from characterization to therapeutics. *Chem. Biodivers.* 4, 1882–1902.

Van Laere, K., Casteels, C., Lunsken, S., Goffin, K., Grachev, I.D., Bormans, G., and Vandenberghe, W. (2012). Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo. *Neurobiology of Aging* 33, 620.e1–e620.e8.

De Lago, E., Gómez-Ruiz, M., Moreno-Martet, M., and Fernández-Ruiz, J. (2009). Cannabinoids, multiple sclerosis and neuroprotection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2, 645–660.

De Lago, E., Moreno-Martet, M., Cabranes, A., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J. (2012a). Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology* 62, 2299–2308.

L

Lambert, D.M., and Di Marzo, V. (1999). The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr. Med. Chem.* 6, 757–773.

Lanciego, J.L., Barroso-Chinea, P., Rico, A.J., Conte-Perales, L., Callén, L., Roda, E., Gómez-Bautista, V., López, I.P., Lluís, C., Labandeira-García, J.L., et al. (2011). Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 25, 97–104.

Lastres-Becker, I., Cebeira, M., de Ceballos, M.L., Zeng, B.Y., Jenner, P., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J.J. (2001). Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1827–1832.

Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J.A., Mechoulam, R., and Fernández-Ruiz, J. (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 19, 96–107.

Lauckner, J.E., Hille, B., and Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 19144-19149.

Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., and Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 2699-2704.

Lawrence, D.K., and Gill, E.W. (1975). The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol. Pharmacol.* *11*, 595-602.

Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Böhme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., et al. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* *283*, 401-404.

Leggett, J.D., Aspley, S., Beckett, S.R.G., D'Antona, A.M., Kendall, D.A., and Kendall, D.A. (2004). Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* *141*, 253-262.

Leker, R.R., Gai, N., Mechoulam, R., and Ovadia, H. (2003). Drug-induced hypothermia reduces ischemic damage: effects of the cannabinoid HU-210. *Stroke* *34*, 2000-2006.

Lemberger, L., and Rowe, H. (1975). Clinical pharmacology of nabilone, a cannabinol derivative. *Clin. Pharmacol. Ther.* *18*, 720-726.

Lerner, T.N., Horne, E.A., Stella, N., and Kreitzer, A.C. (2010). Endocannabinoid signaling mediates psychomotor activation by adenosine A2A antagonists. *J. Neurosci.* *30*, 2160-2164.

Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2006). Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* *45*, 4720-4726.

Lévénès, C., Daniel, H., Soubrié, P., and Crépel, F. (1998). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. (Lond.)* *510* (Pt 3), 867-879.

Lévénès, C., Daniel, H., Soubrié, P., and Crépel, F. (1998a). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Physiology* *510*, 867-879.

Lévénès, C., Daniel, H., Soubrié, P., and Crépel, F. (1998b). Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* *510*, 867-879.

Levi-Montalcini, R. (1952). Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *55*, 330-344.

Li, Q., Ma, H.-J., Song, S.-L., Shi, M., Ma, H.-J., Li, D.-P., and Zhang, Y. (2012). Effects of anandamide on potassium channels in rat ventricular myocytes: a suppression of I(to) and augmentation of K(ATP) channels. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *302*, C924-C930.

Lin, K.-P., and Soong, B.-W. (2002a). Peripheral neuropathy of Machado-Joseph disease in Taiwan: a morphometric and genetic study. *Eur. Neurol.* *48*, 210-217.

Linnaeus C (1753). *Species Plantarum*.

López-Miranda, V., Herradón, E., and Martín, M.I. (2008). Vasorelaxation caused by cannabinoids: mechanisms in different vascular beds. *Curr Vasc Pharmacol* *6*, 335-346.

Liu, J., Gao, B., Mirshahi, F., Sanyal, A.J., Khanolkar, A.D., Makriyannis, A., and Kunos, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* 346 Pt 3, 835–840.

Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Huang, B.X., Kim, H.-Y., Luquet, S., Palmiter, R.D., Krystal, G., Rai, R., Mahadevan, A., et al. (2008). Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54, 1–7.

Liu, J., Tang, T.-S., Tu, H., Nelson, O., Herndon, E., Huynh, D.P., Pulst, S.-M., and Bezprozvanny, I. (2009). Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J Neurosci* 29, 9148–9162.

Lograno, M.D., and Romano, M.R. (2004). Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 55–62.

Lorivel, T., and Hilber, P. (2007). Motor effects of delta 9 THC in cerebellar Lurcher mutant mice. *Behav. Brain Res.* 181, 248–253.

Lu, K., Psakhye, I., and Jentsch, S. (2014). A new class of ubiquitin-Atg8 receptors involved in selective autophagy and polyQ protein clearance. *Autophagy* 10, 2381–2382.

M

Maccarrone, M., Lorenzon, T., Bari, M., Melino, G., and Finazzi-Agro, A. (2000). Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 31938–31945.

Maccarrone, M., Carboni, A., Parolaro, D., Margonelli, A., Massi, P., Bari, M., Battista, N., and Finazzi-Agrò, A. (2002). Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 126–140.

Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol* 299–325.

Mackie, K. (2008). Signaling via CNS cannabinoid receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286, S60–S65.

Mackie, K., Lai, Y., Westenbroek, R., and Mitchell, R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J. Neurosci.* 15, 6552–6561.

Macpherson, L.J., Dubin, A.E., Evans, M.J., Marr, F., Schultz, P.G., Cravatt, B.F., and Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* 445, 541–545.

Mahavadi, S., Sriwai, W., Huang, J., Grider, J.R., and Murthy, K.S. (2014). Inhibitory signaling by CB1 receptors in smooth muscle mediated by GRK5/ β -arrestin activation of ERK1/2 and Src kinase. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 306, G535–G545.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.

Manto, M.-U. (2005). The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 4, 2–6.

Marcaggi, P. (2014). Cerebellar Endocannabinoids: Retrograde Signaling from Purkinje Cells. *Cerebellum*.

Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368–376.

Marmolino, D., and Manto, M. (2010a). Past, Present and Future Therapeutics for Cerebellar Ataxias. *Curr Neuropsychopharmacol* 8, 41-61.

Marsicano, G., and Lutz, B. (2006). Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J. Endocrinol. Invest.* 29, 27-46.

Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B., and Behl, C. (2002). Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J. Neurochem.* 80, 448-456.

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., et al. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84-88.

Martin, B.R., Compton, D.R., Thomas, B.F., Prescott, W.R., Little, P.J., Razdan, R.K., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Mechoulam, R., and Ward, S.J. (1991). Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 471-478.

Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2002). Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* 159, 379-387.

Martínez-Pinilla, E., Reyes-Resina, I., Oñatibia-Astibia, A., Zamarbide, M., Ricobaraza, A., Navarro, G., Moreno, E., Dopeso-Reyes, I.G., Sierra, S., Rico, A.J., et al. (2014). CB1 and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum. *Exp. Neurol.* 261, 44-52.

Martire, A., Tebano, M.T., Chiodi, V., Ferreira, S.G., Cunha, R.A., Köfalvi, A., and Popoli, P. (2011). Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry* 116, 273-280.

Di Marzo, V., and Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* 8, 585-589.

Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., and Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-691.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* 21, 521-528.

Di Marzo, V., Hill, M.P., Bisogno, T., Crossman, A.R., and Brotchie, J.M. (2000a). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 14, 1432-1438.

Di Marzo, V., Breivogel, C.S., Tao, Q., Bridgen, D.T., Razdan, R.K., Zimmer, A.M., Zimmer, A., and Martin, B.R. (2000b). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.* 75, 2434-2444.

Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A., and Bisogno, T. (2002c). Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 377-391.

Di Marzo, V., Bifulco, M., and De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3, 771-784.

Massi, P., Valenti, M., Bolognini, D., and Parolaro, D. (2008). Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2289-2298.

Mathew, R.J., Wilson, W.H., Turkington, T.G., and Coleman, R.E. (1998). Cerebellar activity and disturbed time sense after THC. *Brain Res.* 797, 183-189.

Matilla-Dueñas, A. (2012a). Machado-Joseph disease and other rare spinocerebellar ataxias. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 172–188.

Matilla-Dueñas, A. (2012b). The ever expanding spinocerebellar ataxias. Editorial. *Cerebellum* 11, 821–827.

Matilla-Dueñas, A., Sánchez, I., Corral-Juan, M., Dávalos, A., Alvarez, R., and Latorre, P. (2010). Cellular and molecular pathways triggering neurodegeneration in the spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 9, 148–166.

Matilla-Dueñas, A., Corral-Juan, M., Volpini, V., and Sanchez, I. (2012a). The spinocerebellar ataxias: clinical aspects and molecular genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 351–374.

Matilla-Dueñas, A., Corral-Juan, M., Volpini, V., and Sanchez, I. (2012d). The Spinocerebellar Ataxias: Clinical Aspects And Molecular Genetics. In *Neurodegenerative Diseases, S.I.A.Bs. MSc*, ed. (Springer US), pp. 351–374.

Matilla-Dueñas, A., Ashizawa, T., Brice, A., Magri, S., McFarland, K.N., Pandolfo, M., Pulst, S.M., Riess, O., Rubinsztein, D.C., Schmidt, J., et al. (2014a). Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 13, 269–302.

Matsuda, L.A. (1997). Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit Rev Neurobiol* 11, 143–166.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561–564.

Matsuda, L.A., Bonner, T.I., and Lolait, S.J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327, 535–550.

Mátyás, F., Watanabe, M., Mackie, K., Katona, I., and Freund, T.F. (2007). Molecular architecture of the cannabinoid signaling system in the core of the nucleus accumbens. *Ideggyogy Sz* 60, 187–191.

Mausset-Bonnefont, A.L., de Sèze, R., and Privat, A. (2003). Immunohistochemistry as a tool for topographical semi-quantification of neurotransmitters in the brain. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 10, 148–155.

McAllister, S.D., Griffin, G., Satin, L.S., and Abood, M.E. (1999). Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 618–626.

McC Campbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G., et al. (2000). CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2197–2202.

McFarland, M.J., Porter, A.C., Rakhshan, F.R., Rawat, D.S., Gibbs, R.A., and Barker, E.L. (2004). A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J. Biol. Chem.* 279, 41991–41997.

McHugh, D. (2012). GPR18 in microglia: implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. *Br. J. Pharmacol.* 167, 1575–1582.

McHugh, D., Tanner, C., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., and Ross, R.A. (2008). Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol. Pharmacol.* 73, 441–450.

Mechoulam, R., and Hanuš, L. (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chemistry and Physics of Lipids* 108, 1–13.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., and Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-

monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.

Mechoulam, R., Devane, W.A., and Glaser, R. (1999). Cannabinoid Geometry and Biological Activity. In *Marihuana and Medicine*, G.G.N.M. DSc, K.M.S.M. MS, D. Harvey, S.A. DSc, N.P. MD, and R.C. MD, eds. (Humana Press), pp. 65–90.

Mechoulam, R., Parker, L.A., and Gallily, R. (2002a). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol* 42, 11S – 19S.

Mechoulam, R., Spatz, M., and Shohami, E. (2002b). Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci. STKE* 2002.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., and Hanus, L.O. (2007). Cannabidiol-recent advances. *Chem. Biodivers.* 4, 1678–1692.

Mechoulam R, Devane WA, and Glaser R (1992). Cannabinoid geometry and biological activity,. In *Marijuana/Cannabinoid:NeurobiologyandNeurophysiology*, (ed., CRC Press, Boca Ratón), pp. 1–33.

Mestre, L., Docagne, F., Correa, F., Loria, F., Hernangómez, M., Borrell, J., and Guaza, C. (2009). A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 258–266.

Milligan, G., and Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1, S46–S55.

Milman, G., Maor, Y., Abu-Lafi, S., Horowitz, M., Gallily, R., Batkai, S., Mo, F.-M., Offertaler, L., Pacher, P., Kunos, G., et al. (2006). N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2428–2433.

Milne, G.M., Koe, B.K., and Johnson, M.R. (1979). Stereospecific and potent analgetic activity for nantradol—a structurally novel, cannabinoid-related analgetic. *NIDA Res. Monogr.* 27, 84–92.

Modianos, D.T., and Pfaff, D.W. (1976). Brain stem and cerebellar lesions in female rats. I. Tests of posture and movement. *Brain Res.* 106, 31–46.

Moldrich, G., and Wenger, T. (2000). Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21, 1735–1742.

Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* 22, 9742–9753.

Molina-Holgado, F., Lledó, A., and Guaza, C. (1997). Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* 8, 1929–1933.

Mombouli, J.V., Schaeffer, G., Holzmann, S., Kostner, G.M., and Graier, W.F. (1999). Anandamide-induced mobilization of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1593–1600.

Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2006). Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 97, 1676–1689.

Montserrat-de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Giménez, M.D., and Fernández-Arche, M.A. (2014). Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1105–1110.

Monville, C., Torres, E.M., and Dunnett, S.B. (2006). Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J. Neurosci. Methods* 158, 219–223.

Moody, J.S., Kozak, K.R., Ji, C., and Marnett, L.J. (2001). Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase. *Biochemistry* 40, 861–866.

Moraes, L.A., Piqueras, L., and Bishop-Bailey, D. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 110, 371–385.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., and Cerù, M.P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123, 131–145.

Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., and de Lago, E. (2014). Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mice and evaluation of a Sativex®-like combination of phytocannabinoids: interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci Ther* 20, 809–815.

Morgan, N.H., Stanford, I.M., and Woodhall, G.L. (2009). Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology* 57, 356–368.

Moriconi, A., Cerbara, I., Maccarrone, M., and Topai, A. (2010). GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. *Curr. Med. Chem.* 17, 1411–1429.

Muccioli, G.G. (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* 15, 474–483.

Mulder, J., Zilberter, M., Pasquaré, S.J., Alpár, A., Schulte, G., Ferreira, S.G., Köfalvi, A., Martín-Moreno, A.M., Keimpema, E., Tanila, H., et al. (2011). Molecular reorganization of endocannabinoid signalling in Alzheimer’s disease. *Brain* 134, 1041–1060.

Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61–65.

Murata, Y., Yamaguchi, S., Kawakami, H., Imon, Y., Maruyama, H., Sakai, T., Kazuta, T., Ohtake, T., Nishimura, M., Saida, T., et al. (1998). Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Arch. Neurol.* 55, 33–37.

N

Nakano, K.K., Dawson, D.M., and Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology* 22, 49–55.

Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 57, 883–893.

Navarrete, M., and Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 68, 113–126.

Navarrete, M., Díez, A., and Araque, A. (2014). Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369.

Navarro, G., Carriba, P., Gandí, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., and Franco, R. (2008). Detection of Heteromers Formed by Cannabinoid CB1, Dopamine D2, and Adenosine A2A G-Protein-Coupled Receptors by Combining Bimolecular Fluorescence Complementation and Bioluminescence Energy Transfer. *The Scientific World Journal* 8, 1088–1097.

Netzeband, J.G., Conroy, S.M., Parsons, K.L., and Gruol, D.L. (1999). Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca²⁺ signals in cerebellar granule neurons in culture. *J. Neurosci.* 19, 8765–8777.

Nguyen, V.H., Wang, H., Verdurand, M., and Zavitsanou, K. (2012). Differential treatment regimen-related effects of HU210 on CB(1) and D(2)-like receptor functionality in the rat basal ganglia. *Pharmacology* 89, 64-73.

Nogami, M., Takatsu, A., and Ishiyama, I. (1998). Immunohistochemical study of neuron-specific enolase in human brains from forensic autopsies. *Forensic Sci. Int.* 94, 97-109.

Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R.M., and Romero, J. (2004a). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208-213.

Núñez, E., Benito, C., Tolón, R.M., Hillard, C.J., Griffin, W.S.T., and Romero, J. (2008). Glial expression of cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome. *Neuroscience* 151, 104-110.

O

O'Hayre, M., Vázquez-Prado, J., Kufareva, I., Stawiski, E.W., Handel, T.M., Seshagiri, S., and Gutkind, J.S. (2013). The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 412-424.

O'Hearn, E., and Molliver, M.E. (1997). The olivocerebellar projection mediates ibogaine-induced degeneration of Purkinje cells: a model of indirect, trans-synaptic excitotoxicity. *J. Neurosci.* 17, 8828-8841.

Okamoto, Y., Wang, J., Morishita, J., and Ueda, N. (2007). Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem. Biodivers.* 4, 1842-1857.

Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gu, S., and Liu, Q.-R. (2012). CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 26, 92-103.

Onodera, O., Idezuka, J., Igarashi, S., Takiyama, Y., Endo, K., Takano, H., Oyake, M., Tanaka, H., Inuzuka, T., Hayashi, T., et al. (1998). Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease. *Ann. Neurol.* 43, 288-296.

Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Correa, F., Viso, A., López-Rodríguez, M.L., Di Marzo, V., and Guaza, C. (2005a). Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J.* 19, 1338-1340.

Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., and Guaza, C. (2005b). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* 52, 163-168.

O'Shea, R.D. (2002). Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 1018-1023.

O'Sullivan, S.E., and Kendall, D.A. (2010). Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease. *Immunobiology* 215, 611-616.

Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996.

Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C.T., Gardner, L.S., Griffin, G., Jackson, H.C., Procter, M.J., Rasamison, C.M., Tang-Christensen, M., et al. (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.* 3, 167-175.

P

- Pacher, P., and Steffens, S. (2009a). The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 31, 63-77.
- Pacher, P., Bátkai, S., and Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 389-462.
- Pagotto, U., and Pasquali, R. (2006). Endocannabinoids and energy metabolism. *J. Endocrinol. Invest.* 29, 66-76.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., and Pasquali, R. (2006a). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr. Rev.* 27, 73-100.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20, 2405-2407.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M.R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., et al. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain* 132, 3152-3164.
- Pandolfo, P., Silveirinha, V., dos Santos-Rodrigues, A., Venance, L., Ledent, C., Takahashi, R.N., Cunha, R.A., and Köfalvi, A. (2011). Cannabinoids inhibit the synaptic uptake of adenosine and dopamine in the rat and mouse striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 655, 38-45.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., and Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413, 527-531.
- Patel, S., and Hillard, C.J. (2001). Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 629-637.
- Patel, S., Rademacher, D.J., and Hillard, C.J. (2003). Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 880-888.
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.-L., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997a). Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron* 19, 333-344.
- Pazos, M.R., Núñez, E., Benito, C., Tolón, R.M., and Romero, J. (2005). Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 239-247.
- Pazos, M.R., Sagredo, O., and Fernández-Ruiz, J. (2008). The endocannabinoid system in Huntington's disease. *Curr. Pharm. Des.* 14, 2317-2325.
- Perez, M.K., Paulson, H.L., and Pittman, R.N. (1999). Ataxin-3 with an altered conformation that exposes the polyglutamine domain is associated with the nuclear matrix. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2377-2385.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* 74, 129-180.
- Pertwee, R.G. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* 6, 635-664.
- Pertwee, R.G. (2001). Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48, 859-867.
- Pertwee, R.G. (2008). Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 13, 147-159.

Pertwee, R.G., and Ross, R.A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66, 101–121.

De Petrocellis, L., Marini, P., Matias, I., Moriello, A.S., Starowicz, K., Cristino, L., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007). Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp. Cell Res.* 313, 2993–3004.

De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini, P.C., Orlando, P., and Di Marzo, V. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 1007–1015.

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., and Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1479–1494.

De Petrocellis, L., Orlando, P., Moriello, A.S., Aviello, G., Stott, C., Izzo, A.A., and Di Marzo, V. (2012). Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* 204, 255–266.

Pettit, D.A., Harrison, M.P., Olson, J.M., Spencer, R.F., and Cabral, G.A. (1998). Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosci. Res.* 51, 391–402.

Pietropaolo, S., Bellocchio, L., Ruiz-Calvo, A., Cabanas, M., Du, Z., Guzmán, M., Garret, M., and Cho, Y.H. (2015). Chronic cannabinoid receptor stimulation selectively prevents motor impairments in a mouse model of Huntington's disease. *Neuropharmacology* 89, 368–374.

Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 873–884.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., and Rodríguez de Fonseca, F. (2000). The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 218–224.

Poirier, L.J., Lafleur, J., de Lean, J., Guiot, G., Larochelle, L., and Boucher, R. (1974). Physiopathology of the cerebellum in the monkey. 2. Motor disturbances associated with partial and complete destruction of cerebellar structures. *J. Neurol. Sci.* 22, 491–509.

Porter, A.C., Sauer, J.-M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B., et al. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 1020–1024.

Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J.L., Pitcher, J.A., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R.J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14082–14087.

Price, D.A., Martinez, A.A., Seillier, A., Koek, W., Acosta, Y., Fernandez, E., Strong, R., Lutz, B., Marsicano, G., Roberts, J.L., et al. (2009). WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 29, 2177–2186.

Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-Garcia, A., Lutz, B., Maldonado, R., and Ozaita, A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci.* 12, 1152–1158.

Q

Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., and Flores, C.M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 28, 6231–6238.

R

Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C.U., Werner, A., Jones, L.L., and Kreutzberg, G.W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 77–105.

Ramírez, B.G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., and de Ceballos, M.L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci.* 25, 1904–1913.

Ramos, J.A., González, S., Sagredo, O., Gómez-Ruiz, M., and Fernández-Ruiz, J. (2005). Therapeutic potential of the endocannabinoid system in the brain. *Mini Rev Med Chem* 5, 609–617.

Reichenbach, A., Siegel, A., Rickmann, M., Wolff, J.R., Noone, D., and Robinson, S.R. (1995). Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J. Hirnforsch* 36, 509–517.

Richfield, E.K., and Herkenham, M. (1994). Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann. Neurol.* 36, 577–584.

Riedel, G., and Davies, S.N. (2005). Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol* 445–477.

Riess, O., Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P., and Schöls, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7, 125–137.

Riley, B.E., and Orr, H.T. (2006). Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev.* 20, 2183–2192.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., and Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* 350, 240–244.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., et al. (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 644–650.

Rios, C., Gomes, I., and Devi, L.A. (2006a). μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 148, 387–395.

Riquelme, R., Miralles, C.P., and De Blas, A.L. (2002). Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J. Neurosci.* 22, 10720–10730.

Robbe, D., Alonso, G., Chaumont, S., Bockaert, J., and Manzoni, O.J. (2002). Role of p/q-Ca²⁺ channels in metabotropic glutamate receptor 2/3-dependent presynaptic long-term depression at nucleus accumbens synapses. *J. Neurosci.* 22, 4346–4356.

Roberts, L.A., Christie, M.J., and Connor, M. (2002). Anandamide is a partial agonist at native vanilloid receptors in acutely isolated mouse trigeminal sensory neurons. *Br. J. Pharmacol.* 137, 421–428.

Robitaille, Y., Schut, L., and Kish, S.J. (1995). Structural and immunocytochemical features of olivopontocerebellar atrophy caused by the spinocerebellar ataxia type 1 (SCA-1) mutation define a unique phenotype. *Acta Neuropathol.* 90, 572–581.

Rodriguez, J.J., Mackie, K., and Pickel, V.M. (2001). Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J. Neurosci.* *21*, 823–833.

Rodríguez-Cueto, C., Benito, C., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Hernández-Gálvez, M., and Gómez-Ruiz, M. (2014a). Changes in CB(1) and CB(2) receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 1472–1489.

Rodríguez-Cueto, C., Benito, C., Romero, J., Hernández-Gálvez, M., Gómez-Ruiz, M., and Fernández-Ruiz, J. (2014b). Endocannabinoid-hydrolysing enzymes in the post-mortem cerebellum of humans affected by hereditary autosomal dominant ataxias. *Pathobiology* *81*, 149–159.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martín-Calderón, J.L., Gorriti, M.A., and Navarro, M. (1998). Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiol. Dis.* *5*, 483–501.

Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A., and Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol.* *40*, 2–14.

Romero, J., and Orgado, J.M. (2009). Cannabinoids and neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* *8*, 440–450.

Romero, J., García, L., Cebeira, M., Zadrozny, D., Fernández-Ruiz, J.J., and Ramos, J.A. (1995). The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci.* *56*, 2033–2040.

Romero, J., Hillard, C.J., Calero, M., and Rábano, A. (2002b). Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *100*, 85–93.

Romero, J., Lastres-Becker, I., de Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J. (2002c). The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia: biochemical, pharmacological, and therapeutic aspects. *Pharmacology & Therapeutics* *95*, 137–152.

Rosenbaum, D.A. (2014). *Human Motor Control* (Elsevier).

Rosenberg, R.N., Nyhan, W.L., Bay, C., and Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* *26*, 703–714.

Ross, R.A. (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 156–163.

Ross, R.A., Craib, S.J., Stevenson, L.A., Pertwee, R.G., Henderson, A., Toole, J., and Ellington, H.C. (2002). Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 900–907.

Rossi, S., De Chiara, V., Musella, A., Cozzolino, M., Bernardi, G., Maccarrone, M., Mercuri, N.B., Carri, M.T., and Centonze, D. (2010). Abnormal sensitivity of cannabinoid CB1 receptors in the striatum of mice with experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* *11*, 83–90.

Rüb, U., de Vos, R. a. I., Brunt, E.R., Schultz, C., Paulson, H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2002a). Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res.* *953*, 126–134.

Rüb, U., de Vos, R. a. I., Schultz, C., Brunt, E.R., Paulson, H., and Braak, H. (2002b). Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain* *125*, 2115–2124.

Rüb, U., Brunt, E.R., Gierga, K., Schultz, C., Paulson, H., de Vos, R. a. I., and Braak, H. (2003). The nucleus raphe interpositus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J. Chem. Neuroanat.* 25, 115–127.

Rüb, U., Gierga, K., Brunt, E.R., de Vos, R. a. I., Bauer, M., Schöls, L., Bürk, K., Auburger, G., Bohl, J., Schultz, C., et al. (2005). Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the pre-cerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum. *J Neural Transm* 112, 1523–1545.

Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J.C., Seidel, K., Korf, H.-W., and Deller, T. (2013a). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology* 104, 38–66.

Rubio-Araiz, A., Arévalo-Martín, Á., Gómez-Torres, O., Navarro-Galve, B., García-Ovejero, D., Suetterlin, P., Sánchez-Heras, E., Molina-Holgado, E., and Molina-Holgado, F. (2008). The endocannabinoid system modulates a transient TNF pathway that induces neural stem cell proliferation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 38, 374–380.

Rueda, D., Galve-Roperh, I., Haro, A., and Guzmán, M. (2000). The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol. Pharmacol.* 58, 814–820.

Rueda, D., Navarro, B., Martinez-Serrano, A., Guzman, M., and Galve-Roperh, I. (2002). The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 46645–46650.

Ryan, D., Drysdale, A.J., Lafourcade, C., Pertwee, R.G., and Platt, B. (2009). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J. Neurosci.* 29, 2053–2063.

Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* 152, 1092–1101.

S

Safren, N., El Ayadi, A., Chang, L., Terrillion, C.E., Gould, T.D., Boehning, D.F., and Monteiro, M.J. (2014). Ubiquilin-1 overexpression increases the lifespan and delays accumulation of Huntingtin aggregates in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 9.

Sagredo, O., García-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., and Fernández-Ruiz, J. (2007). Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol. Neurobiol.* 36, 82–91.

Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M.R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J.P., Tolón, R.M., Mechoulam, R., Brouillet, E., et al. (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* 57, 1154–1167.

Sagredo, O., Pazos, M.R., Valdeolivas, S., and Fernandez-Ruiz, J. (2012). Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7, 41–48.

Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1359–1372.

Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P., and Guzmán, M. (1998a). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 436, 6–10.

Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Rueda, D., and Guzmán, M. (1998b). Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol. Pharmacol.* 54, 834–843.

Sánchez, C., Rueda, D., Ségui, B., Galve-Roperh, I., Levade, T., and Guzmán, M. (2001). The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein *fan*. *Mol. Pharmacol.* 59, 955–959.

Sánchez, M.G., Ruiz-Llorente, L., Sánchez, A.M., and Díaz-Laviada, I. (2003). Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell. Signal.* 15, 851–859.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., and Garzón, J. (2014). The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Front Pharmacol* 4.

Sañudo-Peña, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernandez-Ruiz, J.J., and Walker, J.M. (2000). Activational role of cannabinoids on movement. *European Journal of Pharmacology* 391, 269–274.

Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J. Mol. Med.* 78, 3–13.

Sattler, R., and Tymianski, M. (2001). Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 24, 107–129.

Schaeffer, E., and Duplantier, A. (2010). Glutamate and Neurodegenerative Disease. In *Neurodegenerative Diseases*, C. Dominguez, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 91–147.

Scherzed, W., Brunt, E.R., Heinsen, H., de Vos, R.A., Seidel, K., Bürk, K., Schöls, L., Auburger, G., Del Turco, D., Deller, T., et al. (2012a). Pathoanatomy of cerebellar degeneration in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and type 3 (SCA3). *Cerebellum* 11, 749–760.

Schnell, S.A., Staines, W.A., and Wessendorf, M.W. (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 719–730.

Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., and Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology* 3, 291–304.

Schultes R E (1970). Random thoughts and queries on the botany of Cannabis. In *He Botany and Chemistry of Cannabis*, (London: J & A Churchil), pp. 11–38.

Schulz, J.B., Borkert, J., Wolf, S., Schmitz-Hübsch, T., Rakowicz, M., Mariotti, C., Schöls, L., Schoels, L., Timmann, D., van de Warrenburg, B., et al. (2010). Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6. *Neuroimage* 49, 158–168.

Scotter, E.L., Abood, M.E., and Glass, M. (2010a). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *Br. J. Pharmacol.* 160, 480–498.

Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E.R.P., den Dunnen, W., Korf, H.-W., and Rüb, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol.* 124, 1–21.

Serra, H.G., Byam, C.E., Lande, J.D., Tousey, S.K., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (2004). Gene profiling links SCA1 pathophysiology to glutamate signaling in Purkinje cells of transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2535–2543.

Shakkottai, V.G., and Fogel, B.L. (2013). Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia. *Neurol Clin* 31.

Shakkottai, V.G., Costa, M. do C., Dell’Orco, J.M., Sankaranarayanan, A., Wulff, H., and Paulson, H.L. (2011). Early Changes in Cerebellar Physiology Accompany Motor Dysfunction in the Polyglutamine Disease Spinocerebellar Ataxia Type 3. *J. Neurosci.* 31, 13002–13014.

Sharir, H., and Abood, M.E. (2010). Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol. Ther.* 126, 301–313.

Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S., and Thayer, S.A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J. Neurosci.* 16, 4322–4334.

Sheng, W.S., Hu, S., Min, X., Cabral, G.A., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K. (2005). Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 β -stimulated human astrocytes. *Glia* 49, 211–219.

Shi, S.R., Cote, R.J., and Taylor, C.R. (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 931–937.

Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005a). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329–332.

Siegel, G.J., and Chauhan, N.B. (2000). Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 199–227.

Silva-Fernandes, A., Costa, M. do C., Duarte-Silva, S., Oliveira, P., Botelho, C.M., Martins, L., Mariz, J.A., Ferreira, T., Ribeiro, F., Correia-Neves, M., et al. (2010). Motor uncoordination and neuropathology in a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease lacking intranuclear inclusions and ataxin-3 cleavage products. *Neurobiology of Disease* 40, 163–176.

Silva-Fernandes, A., Duarte-Silva, S., Neves-Carvalho, A., Amorim, M., Soares-Cunha, C., Oliveira, P., Thirstrup, K., Teixeira-Castro, A., and Maciel, P. (2014a). Chronic treatment with 17-DMAG improves balance and coordination in a new mouse model of Machado-Joseph disease. *Neurotherapeutics* 11, 433–449.

Silvestri, C., and Di Marzo, V. (2013). The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metabolism* 17, 475–490.

Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2006). Endocannabinoid Biosynthesis Proceeding through Glycerophospho-N-acyl Ethanolamine and a Role for α/β -Hydrolase 4 in This Pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 26465–26472.

Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2010). Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo. *Mol Biosyst* 6, 1411–1418.

Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., and Leon, A. (1996). The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 3984–3989.

Small, E., ; Beckstead, H., and Chan, A. The Evolution of Cannabinoid Phenotypes in Cannabis. *Eco. Bot* 29, 219–232.

Smith, P.B., Welch, S.P., and Martin, B.R. (1994). Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1381–1387.

Snider, N.T., Nast, J.A., Tesmer, L.A., and Hollenberg, P.F. (2009). A Cytochrome P450-Derived Epoxygenated Metabolite of Anandamide Is a Potent Cannabinoid Receptor 2-Selective Agonist. *Mol Pharmacol* 75, 965–972.

Sofroniew, M.V., Howe, C.L., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1217–1281.

Solórzano-Santos, F., and Miranda-Novales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 136–141.

Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.-H., Ha, J.-Y., and Han, J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* 44, 89–98.

Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 59–71.

Soong, B., and Paulson, H.L. (2007). Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 438–446.

Soong, B.W., and Liu, R.S. (1998). Positron emission tomography in asymptomatic gene carriers of Machado-Joseph disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 64, 499–504.

Soong, B., Cheng, C., Liu, R., and Shan, D. (1997). Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Ann. Neurol.* 41, 446–452.

Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2004). Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2203–2213.

Stahel, P.F., Smith, W.R., Bruchis, J., and Rabb, C.H. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptors: “key” regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. *PPAR Res* 2008.

Starowicz, K., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacology & Therapeutics* 114, 13–33.

Stefano, G.B. (2000). Endocannabinoid immune and vascular signaling. *Acta Pharmacol. Sin.* 21, 1071–1081.

Steiner, H., Bonner, T.I., Zimmer, A.M., Kitai, S.T., and Zimmer, A. (1999a). Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5786–5790.

Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* 48, 267–277.

Stella, N., Schweitzer, P., and Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773–778.

Van der Stelt, M., and Di Marzo, V. (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* 7, 37–50.

Stienstra, R., Duval, C., Müller, M., and Kersten, S. (2007). PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res* 2007.

Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 57, 563–581.

Suárez, J., Bermúdez-Silva, F.J., Mackie, K., Ledent, C., Zimmer, A., Cravatt, B.F., and de Fonseca, F.R. (2008). Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J. Comp. Neurol.* 509, 400–421.

Sugiura, T., and Waku, K. (2000). 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem. Phys. Lipids* 108, 89–106.

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 89–97.

Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Tonegawa, T., Nakane, S., Kishimoto, S., Yamashita, A., and Waku, K. (1996). 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 58-64.

Sun, Y., and Bennett, A. (2007). Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res* 2007.

Sun, Y., Alexander, S.P.H., Kendall, D.A., and Bennett, A.J. (2006). Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1095-1097.

Sun, Y., Alexander, S.P.H., Garle, M.J., Gibson, C.L., Hewitt, K., Murphy, S.P., Kendall, D.A., and Bennett, A.J. (2007). Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 152, 734-743.

Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., and Fredholm, B.B. (1999). Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog. Neurobiol.* 59, 355-396.

Syed, S.K., Bui, H.H., Beavers, L.S., Farb, T.B., Ficorilli, J., Chesterfield, A.K., Kuo, M.-S., Bokvist, K., Barrett, D.G., and Efanov, A.M. (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E1469-E1478.

Sylantsev, S., Jensen, T.P., Ross, R.A., and Rusakov, D.A. (2013b). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5193-5198.

Szabo, B., and Schlicker, E. (2005). Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol* 327-365.

Szabo, B., Wallmichrath, I., Mathonia, P., and Pfreundtner, C. (2000). Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 97, 89-97.

Szabo, B., Siemes, S., and Wallmichrath, I. (2002a). Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur. J. Neurosci.* 15, 2057-2061.

T

Takahashi, K.A., and Linden, D.J. (2000). Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J. Neurophysiol.* 83, 1167-1180.

Takahashi, M., Ishikawa, K., Sato, N., Obayashi, M., Niimi, Y., Ishiguro, T., Yamada, M., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Kato, T., et al. (2012a). Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* 32, 595-603.

Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., and Ohta, S. (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat. Genet.* 4, 300-304.

Tanimura, A., Kawata, S., Hashimoto, K., and Kano, M. (2009). Not glutamate but endocannabinoids mediate retrograde suppression of cerebellar parallel fiber to Purkinje cell synaptic transmission in young adult rodents. *Neuropharmacology* 57, 157-163.

Tanimura, A., Uchigashima, M., Yamazaki, M., Uesaka, N., Mikuni, T., Abe, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., and Kano, M. (2012). Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12195-12200.

Taniwaki, T., Sakai, T., Kobayashi, T., Kuwabara, Y., Otsuka, M., Ichiya, Y., Masuda, K., and Goto, I. (1997). Positron emission tomography (PET) in Machado-Joseph disease. *J. Neurol. Sci.* 145, 63-67.

Taroni, F., and DiDonato, S. (2004). Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 641–655.

Terrazzino, S., Berto, F., Dalle Carbonare, M., Fabris, M., Guiotto, A., Bernardini, D., and Leon, A. (2004). Stearoyl-ethanolamide exerts anorexic effects in mice via down-regulation of liver stearyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *FASEB J.* 18, 1580–1582.

Thathiah, A., and De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 73–87.

Tozzi, A., de Iure, A., Marsili, V., Romano, R., Tantucci, M., Di Filippo, M., Costa, C., Napolitano, F., Mercuri, N.B., Borsini, F., et al. (2012). A2A adenosine receptor antagonism enhances synaptic and motor effects of cocaine via CB1 cannabinoid receptor activation. *PLoS ONE* 7.

Tsou, K., Nogueron, M.I., Muthian, S., Sañudo-Pena, M.C., Hillard, C.J., Deutsch, D.G., and Walker, J.M. (1998a). Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 254, 137–140.

Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., and Walker, J.M. (1998b). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.

Turner, C.E., Elsohly, M.A., and Boeren, E.G. (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *J. Nat. Prod.* 43, 169–234.

U

Ueda, N., Puffenberger, R.A., Yamamoto, S., and Deutsch, D.G. (2000). The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chem. Phys. Lipids* 108, 107–121.

Urbanski, M.J., Kovacs, F.E., and Szabo, B. (2010). Endocannabinoid-mediated synaptically evoked suppression of GABAergic transmission in the cerebellar cortex. *Neuroscience* 169, 1268–1278.

V

Valdeolivas, S., Pazos, M.R., Bisogno, T., Piscitelli, F., Iannotti, F.A., Allarà, M., Sagredo, O., Di Marzo, V., and Fernández-Ruiz, J. (2013). The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. *Cell Death Dis* 4.

Valenti, M., Cottone, E., Martinez, R., De Pedro, N., Rubio, M., Viveros, M.P., Franzoni, M.F., Delgado, M.J., and Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J. Neurochem.* 95, 662–672.

Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., et al. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4903–4908.

Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., and Guzmán, M. (2007). Cannabinoids and gliomas. *Mol. Neurobiol.* 36, 60–67.

Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.

Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185–194.

Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., and Piomelli, D. (2005). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol. Pharmacol.* 67, 15-19.

Volkow, N.D., Gillespie, H., Mullani, N., Tancredi, L., Grant, C., Ivanovic, M., and Hollister, L. (1991b). Cerebellar metabolic activation by delta-9-tetrahydrocannabinol in human brain: A study with positron emission tomography and 18F-2-Fluoro-2-deoxyglucose. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 40, 69-78.

W

Waksman, Y., Olson, J.M., Carlisle, S.J., and Cabral, G.A. (1999). The Central Cannabinoid Receptor (CB1) Mediates Inhibition of Nitric Oxide Production by Rat Microglial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 1357-1366.

Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., and Graier, W.F. (2008). Integrin clustering enables anandamide-induced Ca^{2+} signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J. Cell. Sci.* 121, 1704-1717.

Walter, L., and Stella, N. (2004). Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* 141, 775-785.

Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., and Stella, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* 23, 1398-1405.

Wang, D.-J., Su, L.-D., Wang, Y.-N., Yang, D., Sun, C.-L., Zhou, L., Wang, X.-X., and Shen, Y. (2014). Long-Term Potentiation at Cerebellar Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapses Requires Presynaptic and Postsynaptic Signaling Cascades. *J. Neurosci.* 34, 2355-2364.

Wang, G., Tang, W., and Bidigare, R.R. (2005). Terpenoids As Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents. In *Natural Products*, L. Zhang, and A.L. Demain, eds. (Humana Press), pp. 197-227.

Wang, X., Whalley, B.J., and Stephens, G.J. (2013). The du(2J) mouse model of ataxia and absence epilepsy has deficient cannabinoid CB₁ receptor-mediated signalling. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 3919-3933.

Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., and Nilius, B. (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424, 434-438.

Wiley, J.L., Burston, J.J., Leggett, D.C., Alekseeva, O.O., Razdan, R.K., Mahadevan, A., and Martin, B.R. (2005). CB1 cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice. *Br. J. Pharmacol.* 145, 293-300.

Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-682.

Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Möller, T., and Stella, N. (2004). P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3214-3219.

Y

Yamada, M., Sato, T., Tsuji, S., and Takahashi, H. (2008). CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 71-86.

Yang, H.Y., Karoum, F., Felder, C., Badger, H., Wang, T.C., and Markey, S.P. (1999). GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. *J. Neurochem.* 72, 1959–1968.

Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I.P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R.R., and Anand, P. (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6.

Yu, Y.-C., Kuo, C.-L., Cheng, W.-L., Liu, C.-S., and Hsieh, M. (2009). Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J. Neurosci. Res.* 87, 1884–1891.

Z

Zelasko, S., Arnold, W.R., and Das, A. (2015). Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 116–117C, 112–123.

Zhang, X., Maor, Y., Wang, J.F., Kunos, G., and Groopman, J.E. (2010). Endocannabinoid-like N-arachidonoyl serine is a novel pro-angiogenic mediator. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1583–1594.

Zhou, L., Wang, H., Wang, P., Ren, H., Chen, D., Ying, Z., and Wang, G. (2013a). Ataxin-3 protects cells against H₂O₂-induced oxidative stress by enhancing the interaction between Bcl-X(L) and Bax. *Neuroscience* 243, 14–21.

Zhu, P.J. (2006). Endocannabinoid signaling and synaptic plasticity in the brain. *Crit Rev Neurobiol* 18, 113–124.

Zhuang, S.-Y., Bridges, D., Grigorenko, E., McCloud, S., Boon, A., Hampson, R.E., and Deadwyler, S.A. (2005a). Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology* 48, 1086–1096.

Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hohmann, A.G., Herkenham, M., and Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5780–5785.

Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 217–247.

Zoppi, S., Pérez Nieves, B.G., Madrigal, J.L.M., Manzanares, J., Leza, J.C., and García-Bueno, B. (2011). Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology* 36, 805–818.

Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R., and Graier, W.F. (2003). Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1351–1362.

Zuleta, E.B. (2007). El sistema nervioso : desde las neuronas hasta el cerebro humano (Universidad de Antioquia).

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.

VIII. ANEXO

Themed Section: Cannabinoids 2013

RESEARCH PAPER

Changes in CB₁ and CB₂ receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias

Carmen Rodríguez-Cueto^{1,2,3}, Cristina Benito^{1,4},
Javier Fernández-Ruiz^{1,2,3}, Julián Romero⁴,
Mariluz Hernández-Gálvez^{1,2,3,5} and María Gómez-Ruiz^{1,2,3,5}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, ³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, ⁴Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Fundación Hospital Alcorcón, Madrid, Spain and ⁵Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

BACKGROUND AND PURPOSE

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a family of chronic progressive neurodegenerative diseases, clinically and genetically heterogeneous, characterized by loss of balance and motor coordination due to degeneration of the cerebellum and its afferent and efferent connections. Unlike other motor disorders, the possible role of changes in the endocannabinoid system in the pathogenesis of SCAs has not been investigated.

EXPERIMENTAL APPROACH

The status of cannabinoid receptor type 1 (CB₁) and cannabinoid receptor type 2 (CB₂) receptors in the post-mortem cerebellum of SCA patients and controls was investigated using immunohistochemical procedures.

KEY RESULTS

Immunoreactivity for the CB₁ receptor, and also for the CB₂ receptor, was found in the granular layer, Purkinje cells, neurons of the dentate nucleus and areas of white matter in the cerebellum of SCA patients at levels notably higher than controls. Double-labelling procedures demonstrated co-localization of CB₁ and, in particular, CB₂ receptors with calbindin, supporting the presence of these receptors in Purkinje neurons. Both receptors also co-localized with Iba-1 and glial fibrillary acidic protein in the granular layer and white matter areas, indicating that they are present in microglia and astrocytes respectively.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Our results demonstrate that CB₁ and CB₂ receptor levels are significantly altered in the cerebellum of SCA patients. Their identification in Purkinje neurons, which are the main cells affected in SCAs, as well as the changes they experienced, suggest that alterations in endocannabinoid receptors may be related to the pathogenesis of SCAs. Therefore, the endocannabinoid system could provide potential therapeutic targets for the treatment of SCAs and its progression.

LINKED ARTICLES

This article is part of a themed section on Cannabinoids 2013. To view the other articles in this section visit <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2014.171.issue-6>

Abbreviations

CB₁, cannabinoid receptor type 1; CB₂, cannabinoid receptor type 2; DAB, 3,3'-Diaminobenzidine; GFAP, glial fibrillary acidic protein; KPBS, potassium phosphate-buffered saline; SCA, spinocerebellar ataxia; NBB, The Netherlands Brain Bank; TBS, Tris-buffered saline

Correspondence

Javier Fernández-Ruiz and María Gómez-Ruiz, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.
E-mail: jjfr@med.ucm.es; msgr@med.ucm.es

Keywords

cannabinoids; endocannabinoid system; CB₁ and CB₂ receptors; cerebellum; Purkinje neurons; spinocerebellar ataxias

Received

7 May 2013

Revised

5 June 2013

Accepted

16 June 2013

Endocannabinoid-Hydrolysing Enzymes in the Post-Mortem Cerebellum of Humans Affected by Hereditary Autosomal Dominant Ataxias

Carmen Rodríguez-Cueto^{a,c} Cristina Benito^{a,d} Julián Romero^d
Mariluz Hernández-Gálvez^{a-c,e} María Gómez-Ruiz^{a-c,e} Javier Fernández-Ruiz^{a-c}

^aDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, ^bCentro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, and ^cInstituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, ^dLaboratorio de Apoyo a la Investigación, Fundación Hospital Alcorcón, and ^eDepartamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Key Words

Cannabinoids · Endocannabinoid signalling system · Fatty acid amide hydrolase · Monoacyl glycerol lipase · Cerebellum · Purkinje neurons · Spinocerebellar ataxias

Abstract

Objectives: Spinocerebellar ataxias (SCAs) are characterized by a loss of balance and motor coordination due to degeneration of the cerebellum and its afferent and efferent connections. We recently found important changes in cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors in the post-mortem cerebellum of patients affected by different SCAs. **Methods:** We wanted to further explore this issue by analysing the two major endocannabinoid-hydrolysing enzymes, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacyl glycerol lipase (MAGL), in the post-mortem cerebellum of SCA patients and control subjects. **Results:** Immunoreactivity for the FAAH and MAGL enzymes was found in the granular layer, in Purkinje cells, in neurons of the dentate nucleus and in areas of white matter in the cerebellum of patients at levels frequently notably higher than those in control subjects. Using double-labelling procedures, we found co-localization of FAAH and MAGL with calbindin, supporting the presence of these enzymes in

Purkinje neurons. **Conclusions:** Degradative endocannabinoid enzymes are significantly increased in the cerebellum of SCA patients, which would presumably lead to reduced endocannabinoid levels. The identification of these enzymes in Purkinje neurons suggests a relationship with the pathogenesis of SCAs and suggests that the endocannabinoid system could provide potential therapeutic targets for the treatment of disease progression in SCAs.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

Autosomal dominant spinocerebellar ataxias (SCAs) are a group of inherited neurodegenerative disorders, in which the most prevalent cases belong to the family of polyglutaminopathies, that also include Huntington's disease and that are primarily caused by excessive CAG repeats leading to expansion of a polyglutamine tract in different recipient proteins (i.e. huntingtin in Huntington's disease, frequently ataxins but also other proteins in SCAs) [1]. Despite its ubiquitous distribution, the mutant protein frequently affects only specific structures within the central nervous system in these disorders, the cerebel-